

Journal of
Embryology and Experimental
Morphology

VOLUME 2

June 1954

PART 2

PUBLISHED FOR THE COMPANY OF BIOLOGISTS LIMITED

OXFORD : AT THE CLARENDON PRESS

EDITORIAL BOARD

M. ABERCROMBIE (London)	SIDNIE M. MANTON (London)
G. R. DE BEER (London)	P. B. MEDAWAR (London)
J. D. BOYD (Cambridge)	D. R. NEWTH (London)
J. BRACHET (Brussels)	J. PASTEELS (Brussels)
F. W. R. BRAMBELL (Bangor)	CHR. P. RAVEN (Utrecht)
A. M. DALCQ (Brussels)	A. STEFANELLI (Rome)
E. FAURÉ-FREMIET (Paris)	S. TOIVONEN (Helsinki)
HONOR B. FELL (Cambridge)	C. H. WADDINGTON (Edinburgh)
W. J. HAMILTON (London)	M. W. WOERDEMAN (Amsterdam)
J. HOLTFRETER (Rochester, N.Y.)	ET. C. WOLFF (Strasbourg)
S. HÖRSTADIUS (Uppsala)	J. Z. YOUNG (London)
F. E. LEHMANN (Bern)	S. ZUCKERMAN (Birmingham)

Editor: M. ABERCROMBIE

INFORMATION ABOUT THE JOURNAL

The main object of the Journal is to bring together work concerned with all the kinds of developmental process to be found in animals at any stage of their life-history. It will include work on embryology (descriptive, experimental, chemical, physiological), on regeneration and healing, on the developmental changes involved in functional adaptation, on growth, ageing, and other aspects of late morphogenesis. It will publish studies of gametes and gametogenesis where the work is not primarily of cytological interest; and studies of developmental genetics and of the physiology of reproduction where these fall more within its scope than within the usual scope of existing specialized journals. Papers on those aspects of protozoology which have a bearing on morphogenesis will be acceptable. Papers concerned with developmental processes in plants may be included if they connect with zoological aspects of morphogenesis.

The papers published will for the most part be accounts of finished pieces of research. Preliminary reports will not be published. Theses and very long papers are unlikely to be accepted at present. Theoretical and review papers may be published from time to time, as space allows. Contributions may be in English, French, or German. Contributors wishing to use other languages should consult the Editor.

Journal of Embryology and Experimental Morphology is published quarterly. Subscription price £4. 4s. 0d. yearly for the four numbers; for this sum (*prepaid*) the Journal is sent Post Free to any part of the world. Separate numbers price 25s. Correspondence, except that about the subject-matter of the Journal which should be sent to the Editor, should be addressed to the Publisher:

GEOFFREY CUMBERLEGE

OXFORD UNIVERSITY PRESS, AMEN HOUSE, LONDON, E.C. 4

The Embryology of the Telencephalic Fibre Systems in the Mouse

by BENGT KÄLLÉN¹

From the Tornblad Institute for Comparative Embryology, Lund.

Head: Professor Gösta Glimstedt

WITH ONE PLATE

INTRODUCTION

BERGQUIST, Källén, and collaborators, in a series of works summarized by Bergquist & Källén (1954) have studied the early ontogenesis of the central nervous system in vertebrates including, among other problems, the development of the brain nuclei. As is apparent from these papers, nuclear development starts from so-called 'migration areas', i.e. parts of the ventricular wall with a high migration tendency. From these areas cells migrate either in one or in a number of successive periods, giving rise to migration layers which lie one outside the other. These layers may later become subdivided and in this way form localized cell groups or nuclear anlagen.

These studies have also shown that the formation of the nuclei takes place according to a pattern which is very much the same in different vertebrates. The position and the number of migration areas in different brain types is relatively constant. On the other hand, the number of migration layers may vary, and the late subdivisions of the layers into cell groups may also take place differently in different species. In all amniotes which have been studied, however, the number of migration layers is the same in the telencephalon, and the later subdivisions take place in a similar manner. Because of the fact that the formation of the nuclei takes place in so similar a manner in different vertebrates, it is possible to set up a 'Bauplan' for the brain parts investigated and to homologize the nuclei of different animals. This procedure has been discussed by Källén (1951*b*).

The questions for discussion in this paper are the following: (1) Can the sequence in the development of the fibre bundles be correlated with their presumed phylogenetic evolution? (2) Is there any relation between the migration processes and the development of the fibre bundles?

For the morphological studies that are the basis of this paper, the following

¹ Author's address: Tornblad Institute for Comparative Embryology, Biskopsgatan 7, Lund, Sweden.

[*J. Embryol. exp. Morph.* Vol. 2, Part 2, pp. 87-100, June 1954]

are of importance: Windle's (1932-5) papers on the ontogenesis of the fibres in cat embryos, Windle & Baxter's (1936) on the rat, and Tello's (1934) on the mouse.

MATERIAL AND METHODS

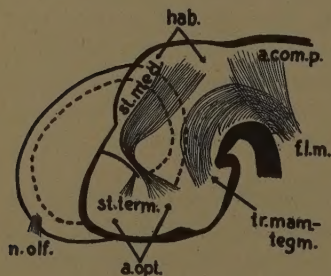
The studies have been carried out on embryos from *Mus musculus* var. *albina*. Close stages have been chosen. The age of the embryos was determined in the following way. A male and a female animal were put together for 24 hours when the female was in the proestrus phase. The age of the embryo was calculated from the midpoint of this time. The embryos were sectioned and stained by the method of Palmgren (1948). From each stage at least three embryos have been used, one sectioned horizontally, one transversally, and one sagittally. The thickness of the sections was always 10 microns. The brains were reconstructed graphically and the fibre bundles marked.

DESCRIPTION OF STAGES

The migration areas are named according to the practice of Bergquist & Källén (1953). The designation of the telencephalic nuclei follows the nomenclature used by the present author (1951a). It is based on the fact that the subpallial telencephalic nuclei develop from three longitudinal columns, called *a*, *b*, and *c* from ventrally to dorsally. Within column *a* one migration takes place, within columns *b* and *c* two migrations. The migration layers are marked as b^I , b^{II} , c^I , and c^{II} . c^I is divided into an external part (c_{ext}^I) and an internal part (c_{int}^I). The former gives rise to the nucleus of the lateral olfactory tract and the nucleus corticalis amygdalae. From c_{int}^I the globus pallidus is formed rostrally and the nucleus centralis amygdalae caudally. For further details the reader is referred to the papers cited.

Stage 1. Age 12 days 16 hours.

The medial longitudinal fascicle is already developed and relatively large.



TEXT-FIG. 1. Reconstruction of the brain in medial view in stage 1. The median section surface is black and the fibre bundles developed are marked with whole lines. *a.com.p.*, area commissurae posterioris; *a.opt.*, area optica; *f.l.m.*, fasciculus longitudinalis medialis; *hab.*, ganglion habenulae anlage; *n.olf.*, olfactory nerve; *st.med.*, stria medullaris; *st.term.*, stria terminalis; *tr.mam-tegm.*, tractus mamillo-tegmentalis.

Magnification $\times 65$.

Rostrally it is attached to a mamillo-tegmental tract. There are also fibres from the area commissurae posterioris entering the fascicle (Text-fig. 1).

Laterally in the dorsal part of the diencephalon—area medialis and caudalis

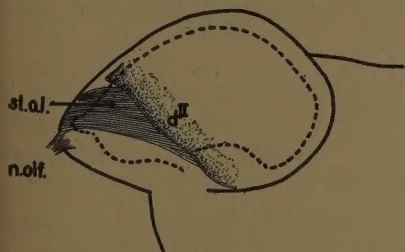
thalami—there is a thin fibre layer, *st. med.*, which seems to split up in the dorsal part of the area caudalis, i.e. the habenular anlage. Ventrally the fibres are collected into a relatively compact bundle, lying dorsal to the foramen Monroi and ending in the area optica. Just rostrally hereto a few fibres, *st. term.*, connect the area optica with the caudal part of the b^{II} -layer in the telencephalon.

The olfactory nerve enters the telencephalon rostrally at the limit between the area dorsalis telencephali and the cell column *c*. No fibres can be seen around the place of entrance, so there are no secondary olfactory tracts developed. No other telencephalic fibres can be seen.

The nuclear differentiation has proceeded far at this stage. There are two migration layers developed in the columns *b* and *c*.

Stage 2. Age 13 days 6 hours.

A bundle runs caudally from the bulbus olfactorius in this stage, the stria olfactoria lateralis (Text-fig. 2). It lies ventral to the limit between the pallium



TEXT-FIG. 2. Reconstruction of the brain in lateral view in stage 2. The shadowed part is the ventral part of the pallium (area dorsalis telencephali or *d*). d^{II} , second migration layer in the pallium; *n.olf.*, olfactory nerve; *st.o.l.*, stria olfactoria lateralis. Magnification $\times 35$.

(d^{II}) and part of the subpallium (c_{ext}^I) and lateral to the latter structure (Plate, fig. A). Caudally it can be followed to the caudal border of the foramen Monroi. Fibres from it enter the pallial cortex and c_{ext}^I . No medial olfactory stria can be seen.

Two bundles begin in c_{int}^I (Text-fig. 3). In the rostral part of it—the future globus pallidus—a thick bundle begins and runs caudally to the caudal border of the foramen Monroi where it enters the diencephalon and spreads over the optic area and the hypothalamus, the area medialis and caudalis thalami. It represents an ansa lenticularis. From the caudal part of c_{int}^I fibres collect in a thin layer, lying dorsal to the ansa lenticularis and crossing this bundle on a level with the foramen Monroi. Some fibres also come from c^{II} and b^{II} —i.e. anlagen of the amygdaloid nuclei—and run through b^{II} —i.e. the anlage of the bed of stria terminalis. It must therefore represent a stria terminalis. The position of the bundle in relation to the ansa lenticularis is seen in Text-figs. 3 and 4.

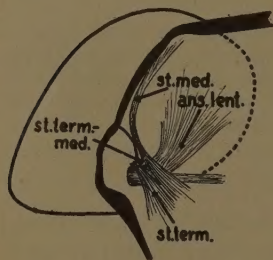
The relatively diffuse bundle, described as *st. med.* in stage 1, is now collected in the rostro-dorsal part of the diencephalon. It still connects the anlage of the habenular ganglion with the area optica and now also with the area rostralis

thalami. It thus lies in the same position as the stria medullaris of the adult brain and is connected with the area optica as is the stria medullaris. It must therefore represent a stria medullaris. As is apparent from Text-fig. 4, the stria



TEXT-FIG. 3. Reconstruction of the brain in dorsal view in stage 2. The hemisphere is cut horizontally and the section surface is black. The shadowed mass is c_{int}^{II} , i.e. the anlage of, amongst other structures, the globus pallidus. *ans. lent.*, ansa lenticularis; b^{II} , second migration layer of the middle subpallial column; c^{II} , second migration layer of the dorsalmost subpallial column; *st. term.*, stria terminalis. Magnification $\times 35$.

terminalis, the stria medullaris, and the ansa lenticularis cross at the caudal level of the foramen Monroi. A fibre bundle then connects the stria terminalis and the stria medullaris. Such a connexion has been described in the adult brain by Gurdjian (1925) among others.



TEXT-FIG. 4. Reconstruction of the brain in medial view in stage 2. The median section surface is black, the hidden parts of the hemisphere contour are dotted. *ans. lent.*, ansa lenticularis; *st. med.*, stria medullaris; *st. term.*, stria terminalis; *st. term.-med.*, connexion between stria terminalis and medullaris.

Magnification $\times 35$.

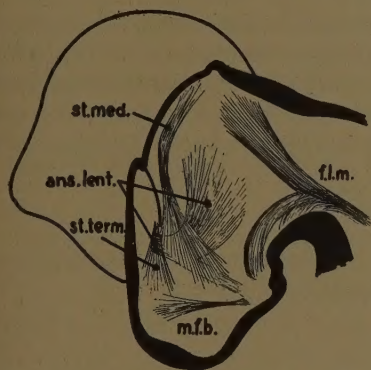
Stage 3. Age 13 days 19 hours.

The lateral olfactory stria has the same position and much the same appearance as in the previous stage, but is a little denser. A very short and indistinct medial olfactory stria can be seen at this stage.

The stria medullaris has grown bigger but is built up in the same way as in previous stages. The ansa lenticularis seems to send fibres chiefly to the area caudalis and medialis thalami, the hypothalamic fibres being rather insignificant (Text-fig. 5).

A new, rather diffuse bundle can be observed in this stage. It begins in the hypothalamus with rather big cells of origin and runs in a rostral direction towards the area optica and the region immediately rostral to it. This bundle must represent the first-developed part of the medial forebrain bundle (Text-fig. 5). The stria terminalis is of the same appearance as in earlier stages.

A commissural bundle is now present in the commissura anterior. It extends from the caudal part of c^{II} , on a level with and caudal to the foramen Monroi, to the corresponding part of the other side, and is situated between the c^I and c^{II} layers.



TEXT-FIG. 5. Reconstruction of the brain in medial view in stage 3. The median section surface is black. *ans.lent.*, ansa lenticularis; *f.l.m.*, fasciculus longitudinalis medialis; *m.f.b.*, medial forebrain bundle; *st.med.*, stria medullaris; *st.term.*, stria terminalis. Magnification $\times 25$.

Cortical fibres can now also be seen for the first time, apart from the ascending fibres from the stria olfactoria lateralis to the lateral part of d^{II} (the anlage of the pyriform cortex) previously described. The new fibres run from the latero-caudal part of d^{II} into c_{int}^I where they fuse with the ansa lenticularis.

Stage 4. Age 14 days 7 hours.

The lateral olfactory stria is of the same appearance as in the former stage, but the medial stria has grown much bigger. It is, however, diffuse and splits up in the septum, which has grown important here, the b^{II} part being large. There is no interbulbar component of the medial stria.

A very small tertiary olfactory radiation is present as a bundle between the septum and the medial part of the cortex. This septo-cortical bundle is rostrally rather diffuse but caudally densely packed, and it must represent the rudiment of the fornix. There are also a few fibres present between the septum and the tuberculum olfactorium-anlage (b^I), but no diagonal band is developed.

The stria terminalis is better developed than at earlier stages and has a stronger rostral curvature. It ends in the area optica and the area rostralis thalami.

The medial forebrain bundle is also more strongly developed and extends into the latero-caudal part of the tuberculum olfactorium. Ventral to it lies a small but very distinct bundle which connects the rostral part of the hypothalamus with the supra-optic region.

The cortical fibres form a large association system of transverse bundles, ending in the cortex layer. A large number of descending fibres penetrate the c^{II} formation as a capsula interna, and cross partly in the commissura anterior, the rest lying lateral to the ansa lenticularis as a lateral forebrain fascicle.

The commissura anterior still contains only one fibre bundle, which now, however, collects fibres from the following parts: the caudal part of c^{II} , d^{II} (see above), and the bed nucleus of the commissura anterior (a derivate from b).

Stage 5. Age 15 days 12 hours.

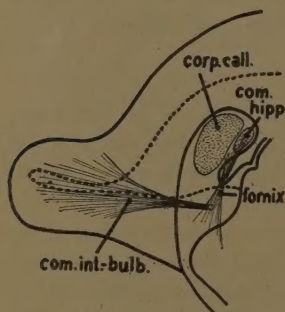
This stage is very similar to the preceding one. The medial telencephalic fascicle extends up to the rostral part of the tuberculum olfactorium. The lateral fascicle is made up of the ansa lenticularis, which ends in the area caudalis and medialis thalami and with a few fibres in the area commissurae posterioris, and of the capsula interna, which also runs down into the area fasciculi longitudinalis medialis and area tuberculi posterioris.

Stage 6. Age 16 days 12 hours.

This stage is similar to the previous one. A faintly developed diagonal band can be seen: a few fibres run from a in a ventrolateral direction.

Stage 7. Age 18 days 12 hours.

This stage is much further developed than the former, but the same main components can be observed. The lateral olfactory bundle runs in a caudo-ventral curve into the caudal lobe, where it splits up. In the stria olfactoria medialis a strong fascicle has developed. It runs rostralwards to the commissura



TEXT-FIG. 6. Reconstruction of the brain in medial view in stage 7. Only the rostral part of the hemisphere with the commissural plate is reconstructed. *com. hipp.*, commissura hippocampi; *com. int. bulb.*, commissura interbulbaris; *corp. call.*, corpus callosum; *fornix*, rudiment of fornix system. Magnification $\times 35$.

anterior where it crosses and returns to the bulb of the other side. This fascicle must be an interbulbar commissure (Text-fig. 6). The dorsal part of the commissure plate is very thick at this stage and in it lie two large commissure bundles (Text-fig. 6), one rostral and one caudal. The latter is a commissura hippocampi and from it the fornix bundles run. These fascicles are rather large now and split up in the septum and the rostral part of the area optica (the preoptic region). It is not yet possible to follow any fibres to the mammillary body. The rostral commissure bundle connects the pallium of the two hemispheres and is thus a corpus callosum.

In the commissura anterior a large intertemporal component can be seen, containing crossed fibres from the lateral part of the cortex (these fibres were

already present in the previous stage) and from c^{II} in the caudal lobe, an anlage of the amygdaloid nuclei. The interbulbar commissure and, caudally, a bundle from the stria terminalis also enter.

The capsula interna is strongly developed in this stage and it now lies rostral to the large ansa lenticularis. The latter is dorsally crossed by the stria terminalis, which lies in the b^{II} layer. The stria terminalis is also strongly developed and still extends from the caudal part of c^{II} , c_{int}^I , and b^{II} to the preoptic area and the area rostralis thalami.

RELATION BETWEEN ONTOGENY AND COMPARATIVE ANATOMY OF FIBRE BUNDLES

In a paper on the development of the telencephalic fibres in the pig, Shaner (1936) supposed that a repetition of phylogenetic evolution takes place during ontogeny. He sought an arrangement of the fibres in young stages which recalled the condition in adult fishes. The present author has tried to correlate the ontogeny of the fibres with their comparative anatomy on the basis of the above results.

If the fibre anatomy in adult mammals and adult lower vertebrates is compared, the following three groups of fibre systems can be distinguished:

1. Bundles which are common to all species, e.g. commissura interbulbaris.
2. Bundles present in lower vertebrates but absent in mammals, e.g. secondary olfactory fibres to the diencephalon.
3. Bundles present in mammals but absent in lower vertebrates, e.g. stria terminalis.

If the phylogenetic evolution of the fibres is repeated in ontogeny, it would be expected that group 1 and, in part at any rate, group 2 would develop before group 3, and that components in group 2 would become completely atrophied or remain as rudimentary bundles.

The extent of development of the secondary and tertiary olfactory fibres varies much in the brains of different species. In fishes there are secondary connexions with the whole of the telencephalon and with large parts of the diencephalon, especially with the habenular ganglion and the hypothalamus. The conditions vary considerably in different species, however (see, among others, Holmgren, 1920; Bäckström, 1924; Heier, 1948). In urodeles the secondary fibres end chiefly in the telencephalon and are especially well developed in the region close to the bulb in the nucleus olfactorius anterior (Herrick, 1948). In amniotes the secondary radiation terminates in the nucleus of the lateral olfactory tract, the medial and lateral amygdaloid nuclei, the tuberculum olfactorium, and the lobus pyriformis (cf. Kappers, Huber, & Crosby, 1936).

During ontogeny in the mouse, the olfactory fibres develop rather early and terminate in the same regions as in the adult brain. On the other hand, no secondary connexions with the diencephalon have been observed. Windle's

(1935) results on the ontogeny of the fibres in the cat indicate that such fibres may exist. He describes a tractus olfacto-subthalamicus (fibres to the area rostralis thalami according to our nomenclature) and a tractus olfacto-hypothalamicus. Windle was not sure, however, that they really represent secondary olfactory fibres. It seems more likely to the present author that they are fascicles, beginning more caudally within the cell column *c*.

In fishes, most telencephalic nuclei are connected with the thalamus, the habenular ganglion, and the hypothalamus by both ascending and descending bundles. In urodeles, too, the greatest part of the hemisphere seems to be connected with lower centres, even if an accumulation of such connexions seems to exist in the caudal part of the hemisphere (in Herrick's strio-amygdaloid complex). In amniotes the subpallial connexions with lower centres seem to be mainly restricted to the strio-amygdaloid complex, viz. to c^{II} , $c_{\text{int}}^{\text{I}}$, and in mammals also to d_v . In addition, the pallium has large and important connexions with the brain stem in these animals.

During ontogeny in the mouse, the first fibre system to develop in the telencephalon is the stria terminalis, i.e. a system which is lacking in fishes, where no amygdaloid complex is developed. The fibres ascending to cell column *b* are part of the medial forebrain bundle, a large and important component in the brains of lower animals. These fibres develop very late in the mouse. The pallio-habenular bundles also develop late—they are not present in the oldest stage investigated here—but the pallio-thalamic fibres develop much earlier. In lower vertebrates the former system exists, but the latter acquires importance only in higher animals.

Similar observations can be made on the commissural system. A commissure common to all vertebrates is the commissura interbulbaris. In the mouse it develops late—later than the commissure fibres from the amygdaloid anlage (the caudal part of c^{II} and $c_{\text{int}}^{\text{I}}$) which is lacking in fishes and amphibians.

RELATION BETWEEN FIBRE DEVELOPMENT AND CELL MIGRATION PROCESSES

Many authors have supposed that an important relation exists between cell migration processes in the central nervous system and the development of the fibre fascicles. Kappers (1917 and other papers) tried to explain the phylogenetic shifting of nuclei by supposing that neurites which grow past influence the position of the cell bodies. Many papers have been published on this problem.

From the observations on stage 1 in the present paper it is apparent that the nuclear differentiation has already proceeded far before the fibres start to develop. In the subpallium a second migration layer is developed both in column *b* and in column *c* (Plate, fig. B). The formation of migration areas and migration layers can thus take place before the development of fibre fascicles in the region in question. The subdivision of the migration layer into parts, nuclear anlagen, seems, however, to take place simultaneously with the ingrowth

of fibres in the region. Cell columns *a* and *b* thus split up into the different septal nuclei when the stria olfactoria medialis reaches the septum; c^{II} is divided into a c^{II}_{int} (= nucleus caudatus) and a c^{II}_{ext} (= putamen) when the capsula interna develops, and so on.

It is then a possibility that the ingrowth of fibre fascicles causes the subdivision of the migration layers into parts, though it is not certain that it does so. If such a state of dependence exists, the fibre anatomy may acquire some importance with regard to the homologies of brain nuclei, i.e. for the homologies of the different parts of a certain migration layer in different species. For example, the cell column *a* is divided into an external and a central part (a_{ext} and a nucleus medialis septi respectively, Källén, 1951 *a* and *b*) in both reptiles and mammals. If it can be proved that a certain bundle, e.g. the medial olfactory stria, causes this division in both species, the homology between the parts in the two species is more firmly established than is possible with morphological methods alone (i.e. demonstration of the morphological position of the nuclei). The fibre anatomy can, however, be of importance for homologizing the nuclei only in such special cases (see Källén, 1951*b*).

There is, however, another possible relation between the migration processes and the development of the fibre bundles: the migration areas and layers may direct the outgrowth of the fibres. Such a relationship cannot, of course, be established from morphological observations only. It may be of interest, however, to discuss some of the observations of the present paper in the light of the results of experimentalists who have studied similar phenomena.

It is apparent that the fibre fascicles of the mouse telencephalon often grow along the borders of the migration areas and between the migration layers. The first fibres in the stria olfactoria lateralis thus grow in a caudal direction along the ventral border of *d* (the area dorsalis telencephali). In a similar way the tractus mammillo-thalamicus grows between the area medialis and caudalis thalami (Plate, fig. C). The commissural fibres from c^{II} in stage 3—the first fibres in the anterior commissure—grow between two migration layers (c^I and c^{II} ; Plate, fig. D). Many such examples could be mentioned. In a few cases the fibres from the very beginning grow through cell masses (e.g. the stria terminalis through b^{II}). In these, however, the first tracts seem to be made up of short neuron chains.

As the migration areas and layers develop prior to the fibre fascicles, it may be that the former structures somehow direct the outgrowth of the latter. A very large literature is available on the forces which direct outgrowing neurites; it cannot be reviewed here in detail. It has been suggested that a chemotropism is essential for the orientation of neurites (Cajal, 1893 and others). Many investigators (Ingvar, 1920; Péterfi & Williams, 1933; and especially Marsh & Beams, 1946) have brought forward evidences that electrical forces may play some role. Of these experiments, the only ones that seem to be satisfactory are those of Marsh & Beams. They found, however, that it was necessary to use

relatively strong currents to obtain an effect, and they doubted whether such strong currents were present during normal development, though according to Young (1948) this is possible.

Weiss (1934, 1939, 1941, 1950) has brought forward evidence against the galvanotropic theory of nerve orientation. His experiments and those of Harrison (1935) and others suggest that mechanical factors, especially ultrastructural conditions in the substrate, may play the most important role.

How do these results fit with the observations made above? That the fibres often grow along the borders of the migration areas and layers might be explained by the fact that these parts are built up in a somewhat different way from the areas containing cell bodies (e.g. the migration layers). These 'pathways' between the migration areas might direct the fibre growth, possibly because of the existence of orientated ultrastructure (as in Weiss's theory).

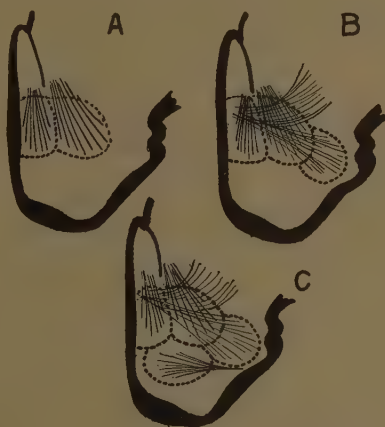
If these 'pathways' really are of importance for the outgrowth of the fibres, it would be expected that the bundles of neurites would be less compact in brains where the 'pathways' are less distinct, e.g. where the cells do not migrate as far as they do in the mammalian brain. In amphibians, dipnoans, elasmobranchs, and *Petromyzon* migration in the telencephalon is rather feeble (Källén, 1951*b*). In these species the secondary olfactory connexions are also diffuse, forming a radiatio olfactoria which can, it is true, be divided into different parts, but not into distinct bundles. The author has also observed in Palmgren-stained *Rana* material that from the very beginning these fibres grow very diffusely. In teleosts and in amniotes, where the migration processes in the telencephalon are much more pronounced and cells, arranged in migration layers, &c., fill the whole of the brain wall, the secondary olfactory projection is made up of distinct tracti olfactorii.

The fibres formed within a differentiation centre do not, however, grow randomly along all possible 'pathways' formed by the migration layers. For instance, the neurites formed within the bulbus olfactorius anlage grow only along the lateral (morphologically caudal) part of the 'pathway' between *d* and the area ventralis telencephali, forming the lateral olfactory stria. Only in later stages do neurites grow also in the opposite direction. Similar phenomena can be observed in the habenulofugal fibres, in the commissural fibres, and so on. These observations indicate that there is some general orientating factor also present—possibly of a bioelectrical nature such as Marsh & Beams's results suggest.

There may be yet another relation present between migration areas and outgrowing neurites. According to Coghill's (1929) observations and Burr's (1932) experiments with transplanted nasal pits, neurites growing in from the periphery are attracted by every local cell proliferation in the brain. In the same way, neurites growing out from the brain are attracted by cell proliferations in extra-central tissues (Detwiler, 1923, 1936; Weiss, 1939, and others). According to Weiss also intracerebral fibres may be attracted by proliferating cells. Observations

on malformations made by Brodal, Bonnevie & Harkmark (1944), Bonnevie & Brodal (1946), and Brodal (1945, 1946) show that fibres growing into the cerebellum invade 'wrong' regions, if the 'right' regions are lacking. These 'wrong' regions are then always in a state of rapid proliferation. Harkmark (1954), however, claims that his later experiments do not support this opinion.

Considered in conjunction with the fact that the nuclei develop from migration areas, which, according to Bergquist (1932), coincide in position with proliferation centres, this hypothesis explains the fact that fibres grow into the migration areas they pass; as, for instance, the stria olfactoria lateralis branches into *d* and *c* which surround the bundle, and large fascicles branch from the ansa lenticularis and enter the area medialis and caudalis thalami, both lying dorsal to the ansa. Many such examples could be given.



TEXT-FIG. 7. Scheme of the mode of development of the fibre tracts to the preoptic region. Further explanation in text. A, stage 1. B, stage 2. C, stage 3.

If this hypothesis is correct, the differentiation centres ought to be connected with all the migration areas lying in the direction of the outgrowing neurites. As this is not the case, it might be supposed that some sort of saturation is reached in an area when it has been entered by a certain number of fibres. The following observations support this suggestion. In the first mouse stage described above, two systems are developed at the di-telencephalic junction: the stria terminalis and the stria medullaris. The stria terminalis extends from the caudal part of *c* in a ventral direction and ends immediately in the rostral part of the area optica. The stria medullaris extends from the habenular anlage in a ventral direction and ends in the caudal part of the area optica. When a third system, the ansa lenticularis, develops from the rostral part of *c*, it grows

caudally and ends in a part of the area optica not previously reached by any fibres: caudal to the end-branches of the stria medullaris. This bundle also ends in the area rostralis, medialis, and caudalis thalami, all areas that have not previously been reached by fibres. Finally, the medial forebrain bundle grows up from the hypothalamus and ends in the part of the area optica not previously reached by fibres, i.e. the ventro-rostral part. These facts are schematically shown in Text-fig. 7.

The above observations and the experimental results to be found in the previous literature on the subject thus suggest possible mechanisms for the formation of the first fibre bundles in the brain. Later, when the proliferation processes have ceased and the migration layers are dissolved by a scattering of the cells, new fibre systems are formed, but it is not impossible that the primary fibre skeleton then acts as a system of 'pioneering fibres' (Weiss, 1950), directing the outgrowth of the secondary bundles.

SUMMARY

1. The ontogeny of the fibres in the telencephalon of *Mus musculus* has been studied. Reconstructions have been made using seven different stages. The formation of some telencephalic and diencephalic fascicles is described.

2. The agreement supposed by Shaner (1936) to exist between the phylogeny and ontogeny of the fascicles is not supported by the present investigation.

3. The migration areas and migration layers can develop before the fibre fascicles are formed, and thus without any influence from them. The division of the migration layers into nuclei takes place simultaneously with the entrance of the fibres into the layers, and hence a causal relation may exist between these two processes. The fibre anatomy may be of some importance with regard to establishing the homologies of the late subdivisions of the migration layers.

4. The spaces between the migration areas and layers seem to act as pathways for the outgrowing neurites. The migration areas, which are also proliferation centres, seem to attract the neurites.

REFERENCES

- BÄCKSTRÖM, K. (1924). Contributions to the forebrain morphology in selachians. *Acta zool., Stockh.* 5, 123-270.
- BERGQUIST, H. (1932). Zur Morphologie des Zwischenhirns bei niederen Wirbeltieren. *Acta zool., Stockh.* 13, 57-303.
- & KÄLLÉN, B. (1953). Studies on the topography of the migration areas in the vertebrate brain. *Acta anat.* 17, 353-69.
- (1954). Notes on the early histogenesis and morphogenesis of the central nervous system in vertebrates. *J. comp. Neurol.* In press.
- BONNEVIE, K., & BRODAL, A. (1946). Hereditary hydrocephalus in the house mouse. IV. The development of the cerebellar anomalies during foetal life with notes on the normal development of the mouse cerebellum. *Skr. norske VidenskAkad. I MN. Kl. (IV)*, pp. 1-60.
- BRODAL, A. (1945). Defective development of the cerebellar vermis (partial agenesis) in a child. *Skr. norske VidenskAkad. I MN. Kl. (III)*, pp. 1-40.

- BRODAL, A., (1946). Correlated changes in nervous tissue in malformations of the central nervous system. *J. Anat., Lond.* **80**, 88–93.
- BONNEVIE, K., & HARKMARK, W. (1944). Hereditary hydrocephalus in the house mouse. II. The anomalies of the cerebellum. Partial defective development of the vermis. *Skr. norske Vidensk. Akad. 1 MN. Kl. (VIII)*, pp. 1–42.
- BURR, H. S. (1932). An electrodynamic theory of development suggested by studies of proliferation rates in the brain of *Amblystoma*. *J. comp. Neurol.* **56**, 347–71.
- CAJAL, S. RAMON Y (1893). La rétine des vertébrés. *Cellule*, **9**, 121–258.
- COGHILL, G. E. (1929). *Anatomy and the Problem of Behaviour*. New York: Macmillan.
- DETWILER, S. R. (1923). Experiments on the reversal of the spinal cord in *Amblystoma* embryos at the level of the anterior limb. *J. exp. Zool.* **38**, 293–321.
- (1936). *Neuroembryology. An Experimental Study*. New York: Macmillan.
- GURDJIAN, E. S. (1925). Olfactory connections in the albino rat, with special reference to the stria medullaris and the anterior commissure. *J. comp. Neurol.* **38**, 127–63.
- HARKMARK, W. (1954). Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons. A morphological and experimental investigation on chick embryos. *J. comp. Neurol.* **100**, 115–210.
- HARRISON, R. G. (1935). The origin and development of the nervous system studied by the methods of experimental embryology. *Proc. roy. Soc. B*, **118**, 155–96.
- HEIER, P. (1948). Fundamental principles in the structure of the brain. A study of the brain of *Petromyzon fluviatilis*. *Acta anat. Suppl.* VIII.
- HERRICK, C. J. (1948). *The Brain of the Tiger Salamander*. Chicago: The University Press.
- HOLMGREN, N. (1920). Zur Anatomie und Histologie des Vorderhirns der Teleostier. *Acta zool., Stockh.* **1**, 137–315.
- INGVAR, S. (1920). Reaction of cells to the galvanic current in tissue cultures. *Pros. Soc. exp. Biol., N.Y.* **17**, 198–9.
- KÄLLÉN, B. (1951a). The nuclear development in the mammalian forebrain with special regard to the subpallium. *K. fysiogr. Sällsk. Lund Handl. N.F.* **61**, no. 9, pp. 1–43.
- (1951b). Embryological studies on the nuclei and their homologization in the vertebrate forebrain. *K. fysiogr. Sällsk. Lund Handl. N.F.* **62**, no. 5, pp. 1–36.
- KAPPERS, C. U. ARIËNS (1917). Further contributions on neurobiotaxis. IX. An attempt to compare the phenomenon of neurobiotaxis with other phenomena of taxis and tropism. The dynamic polarization of the neurone. *J. comp. Neurol.* **27**, 261–98.
- HUBER, C., & CROSBY, E. C. (1936). *The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates, including Man*, vol. ii. New York: Macmillan.
- MARSH, G., & BEAMS, H. W. (1946). *In vitro* control of growing chick nerve fibers by applied electric currents. *J. cell. comp. Physiol.* **27**, 139–57.
- PALMGREN, A. (1948). A rapid method for selective silver staining of nerve fibres and nerve endings in mounted paraffin sections. *Acta zool., Stockh.* **29**, 377–92.
- PÉTERFI, T., & WILLIAMS, S. C. (1933). Elektrische Reizversuche an gezüchteten Gewebezellen. I. Versuche an Nervenzellen. *Arch. exp. Zellforsch.* **14**, 210–57.
- SHANER, R. F. (1936). Development of the finer structure and fiber connections of globus pallidus, corpus of Luys and substantia nigra in the pig. *J. comp. Neurol.* **64**, 213–33.
- TELLO, J. F. (1934). Les différenciations neurofibrillaires dans le prosencéphale de la souris de 4 à 5 millimètres. *Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madr.* **29**, 339–95.
- WEISS, P. (1934). *In vitro* experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. exp. Zool.* **68**, 393–448.
- (1939). *Principles of Development. A Text in Experimental Embryology*. New York: Henry Holt & Co.
- (1941). Nerve patterns. The mechanism of nerve growth. 3rd Symposium on Development and Growth. *Growth*, **5**, 163–203.
- (1950). The deplantation of fragments of nervous system in amphibians. I. Central reorganization and the formation of nerves. *J. exp. Zool.* **113**, 397–462.
- WINDLE, W. F. (1932a). The neurofibrillar structure of the 7 mm. cat embryo. *J. comp. Neurol.* **55**, 99–138.
- (1932b). The neurofibrillar structure of the 5.5 mm. cat embryo. *J. comp. Neurol.* **55**, 315–31.

- WINDLE, W. F. (1933). Neurofibrillar development in the central nervous system of cat embryos between 8 and 12 mm. long. *J. comp. Neurol.* **58**, 643-725.
- (1935). Neurofibrillar development of cat embryos. Extent of development in the telencephalon and diencephalon up to 15 mm. *J. comp. Neurol.* **63**, 139-72.
- & BAXTER, R. E. (1936). The first neurofibrillar development in albino rat embryos. *J. comp. Neurol.* **63**, 173-85.
- YOUNG, J. Z. (1948). Growth and differentiation of nerve fibres. *Symp. Soc. exp. Biol.* **2**, 57-74.

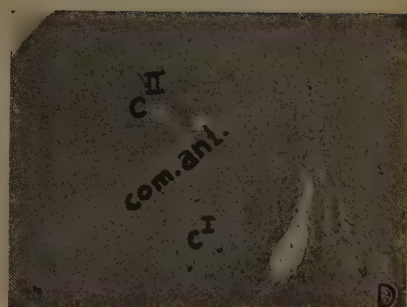
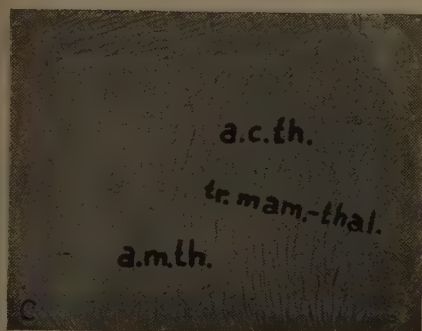
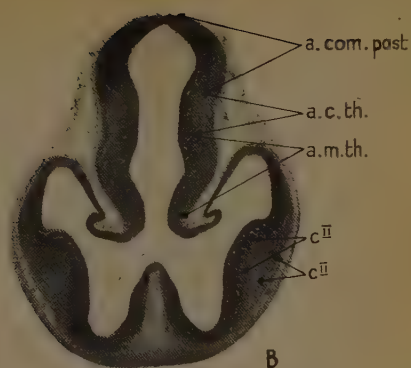
EXPLANATION OF PLATE

FIG. A. Transverse section through the brain in stage 2. The section cuts the hemispheres and the figure shows its lateroventral part. Stained by Palmgren's method. c^I , first migration layer in the dorsalmost subpallial column; c^{II} , second migration layer of the same column; d^{II} , second migration layer of the pallium; *st.o.l.*, stria olfactoria lateralis. Magnification $\times 60$.

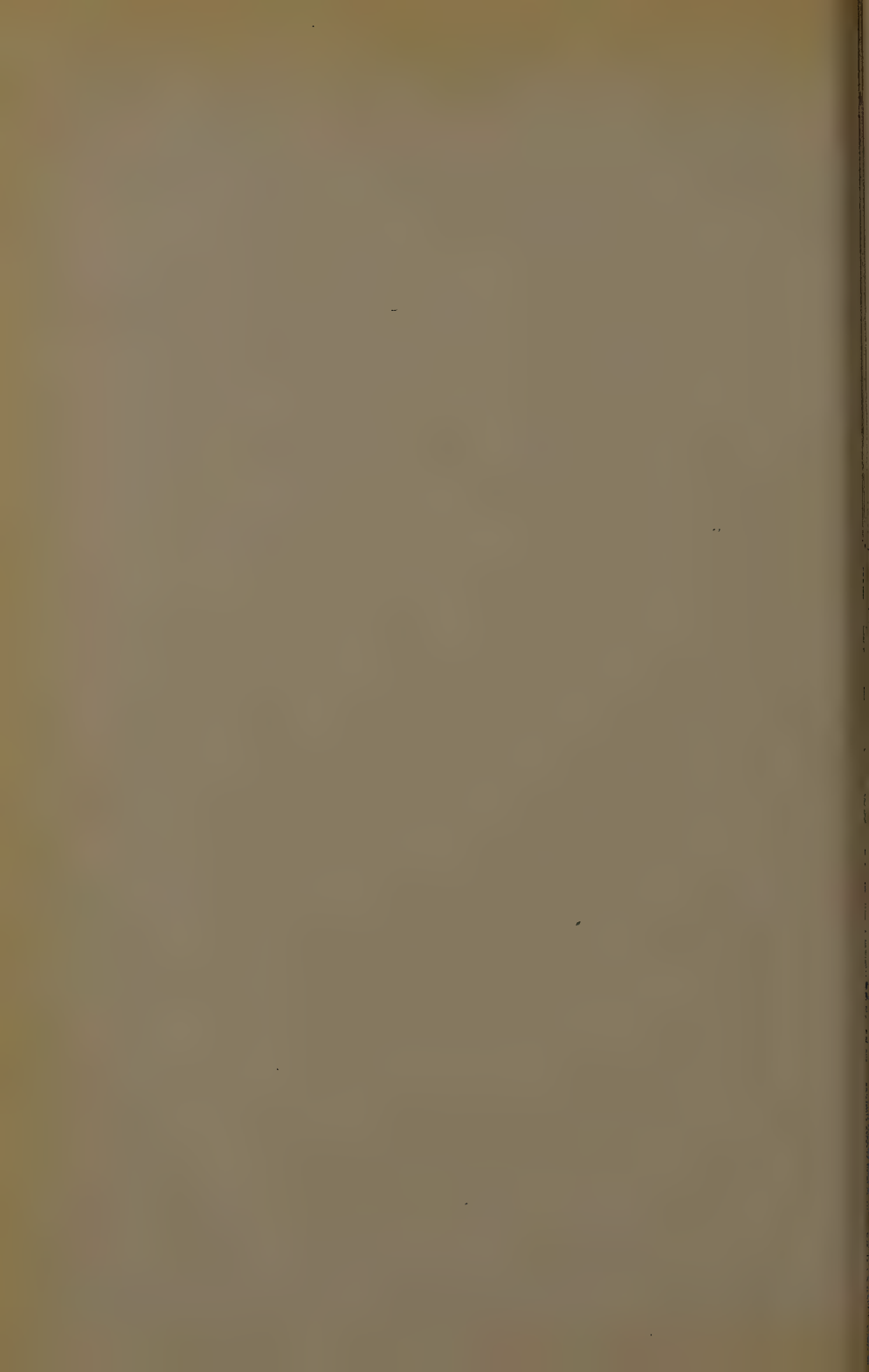
FIG. B. Transverse section through the brain in stage 1, showing the development of the migration areas and cell columns in the telencephalon and diencephalon. *a.c.th.*, area caudalis thalami; *a.com.post.*, area commissurae posterioris; *a.m.th.*, area medialis thalami; c^I , first migration layer in the dorsalmost subpallial column; c^{II} , second migration layer in the same column. Magnification $\times 20$.

FIG. C. Sagittal section through the brain in stage 5, showing the position of the mamillo-thalamic tract (*tr.mam.-thal.*) between area medialis thalami (*a.m.th.*) and area caudalis thalami (*a.c.th.*). Stained by Palmgren's method. Magnification $\times 65$.

FIG. D. Transverse section through the telencephalon in stage 4, showing the bundle of the anterior commissure (*com.ant.*) situated between the migration layers c^I and c^{II} in the dorsalmost subpallial column. Magnification $\times 65$.



B. KÄLLÉN



Determination in the Cranial Neural Crest of the Axolotl

by D. R. NEWTH¹

Department of Zoology and Comparative Anatomy, University College London

WITH ONE PLATE

INTRODUCTION

UNCERTAINTY exists on the stage of development at which the cartilagenous component of the cranial neural crest in amphibian embryos becomes committed to its presumptive fate. Earlier results, and particularly those of Raven (1933, 1935) on *Triturus* and Axolotl, suggested that this determination has occurred by the open medullary plate stage, since pieces of neural fold from the head region could give rise to cartilage after homoplastic transplantation to the trunk. Later this conclusion was challenged by Hörstadius & Sellman (1946). In their hands urodele neural fold from the branchial region failed to form cartilage when transplanted to the flank or when substituted for trunk neural fold, unless other tissues (head mesoderm or endoderm) were transplanted with it, or unless the somites of the host in the region of the graft were mechanically damaged at the time of grafting. They conclude that the differentiation of cartilage from cells of the neural fold takes place only after they have been subject to influences from outside themselves—in other words they are not fully determined at this stage.

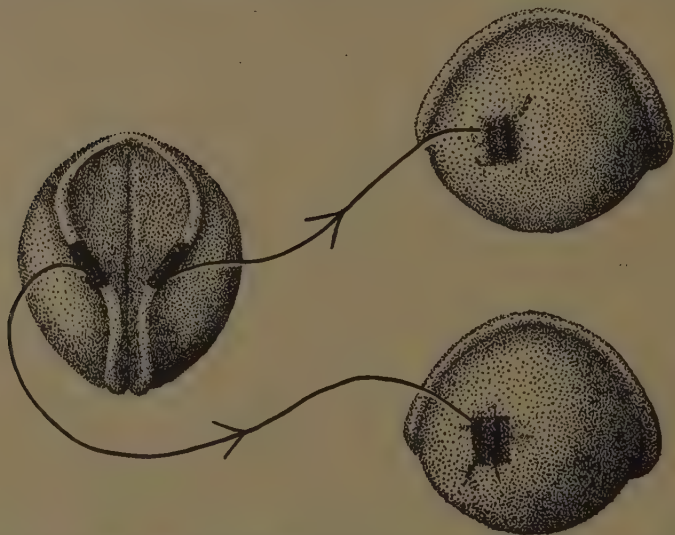
An important, and possibly significant, difference between the experimental procedure of Raven and that of Hörstadius & Sellman lies in the age at which their host animals were killed for histological study. Raven's animals were killed after reaching relatively advanced larval stages. The Swedish authors, by contrast, killed their animals at the beginning of larval life (21 days after operation). At this time, to be sure, the chondrification of the head skeleton is well under way in normal development, but it remains possible that in the ectopic position in the trunk, material determined to form cartilage might take significantly longer than usual to chondrify.

This paper reports an attempt to find out whether the difference between the results of these workers is in fact to be explained by this difference in experimental procedure.

¹ Author's address: Department of Zoology, University College London, Gower Street, W.C.1, U.K.

MATERIAL AND METHODS

Embryos of the Axolotl (*Siredon* sp.) at Harrison stages from $15\frac{1}{2}$ to 20 were decapsulated in Holtfreter solution to which had been added 1 g. of sulphadiazine for every 500 ml. Pieces of neural fold at the level of the future mandibular and branchial arches (i.e. from within regions 4-7 on the fate map of Hörstadius & Sellman) were removed from donor animals and grafted on to hosts of the same or a slightly older stage. Each host received a graft from one



TEXT-FIG. 1. Homoplastic transplantation of neural fold of regions 5-7 to the flank.

side of the donor only (see Text-fig. 1). Care was taken to reduce damage to the host to a minimum, the intention being to tear only the ectoderm in preparing the graft site. After healing the hosts were transferred to Holtfreter solution diluted 10 times and with the concentration of sulphadiazine as before; in this they were kept until they reached hatching stage. From then on they were kept in tank water. On the exhaustion of their yolk reserves they were fed on *Daphnia* and *Tubifex*.

For histological study animals were killed in Bouin's fluid, sectioned transversely at 10μ in the region of the graft, and the sections stained in haematoxylin and eosin.

RESULTS

Eleven animals were killed 30 days after the operation. They had all reached the equivalent of Harrison's stage 40 for *Ambystoma*. A further 21 animals were allowed to live for some time longer and these were not killed until they had both

lived for at least 40 days after the operation and reached the equivalent of Harrison's stage 43, judged by the state of the fore-limb. The fore-limb alone was used for staging as at these later stages the development of *Siredon* departs markedly from that of *Ambystoma maculatum*. The animals killed at 30 days varied in length from 14 to 16 mm., the others from 18 to 24 mm.

TABLE 1

For explanation of the staging of animals and the definition of the region transplanted see text.

Animal	Donor stage	Host stage	Region of crest transplanted	Post-operative age at death (days)	Stage at death	Tissues associated with graft				
						Melanophores	Neural tissue	Mesenchyme	Otic vesicle	Cartilage
2A	16	19	7-8	30	40	+	+	+	—	—
3A	17	19	4-5	30	40	+	+	?	—	—
3B	17	19	4-5	30	40	+	+	?	—	—
4A	17	19	4-5	30	40	+	+	+	—	—
4B	17	19	4-5	30	40	+	+	+	—	—
5A	16	19	6-7	30	40	+	+	+	+	—
5B	16	19	6-7	30	40	+	+	+	—	—
6A	17	19	4-5	30	40	+	+	+	+	—
6B	17	19	4-5	30	40	+	+	+	+	+
7A	17	19	4-5	30	40	+	+	+	—	+
7B	17	19	4-5	30	40	?	+	?	+	—
8B	17	18	4-5	47	45½	+	+	+	+	—
9A	16½	20	6	47	44	+	+	+	+	?
10A	16½	19	5-6	47	43	?	+	+	?	+
11A	17	19	5-6	53	44½	+	+	+	+	—
11B	17	20	5-6	67	44½	+	+	+	+	—
12A	16	20	4	40	44½	+	+	+	—	+
13A	16½	19½	5-7	57	43	+	+	+	+	—
13B	16½	19½	5-7	57	43	+	—	+	+	—
14A	16	19½	5-6	57	44	+	+	+	+	—
14B	16	19½	5-6	71	46	?	+	+	+	—
15A	15½	16½	4-6	51	46	+	+	+	+	—
16A	16	19½	4	45	45	+	—	+	+	—
17A	17	19½	5-6	53	45	+	+	+	+	—
18A	15½	20	4	40	45	+	+	+	+	—
19A	16	19	3-4	40	46	+	+	+	—	+
21A	15½	16½	4-6	67	46	—	—	+	+	—
22A	15½	16½	4-6	59	46	+	+	+	+	—
23A	16	19	4-6	59	46	+	+	+	?	—
23B	16	19	4-6	77	46	+	+	—	—	—
24A	15½	16	4-6	68	46	—	—	+	—	+
24B	15½	19	4-6	77	46	+	+	+	+	—

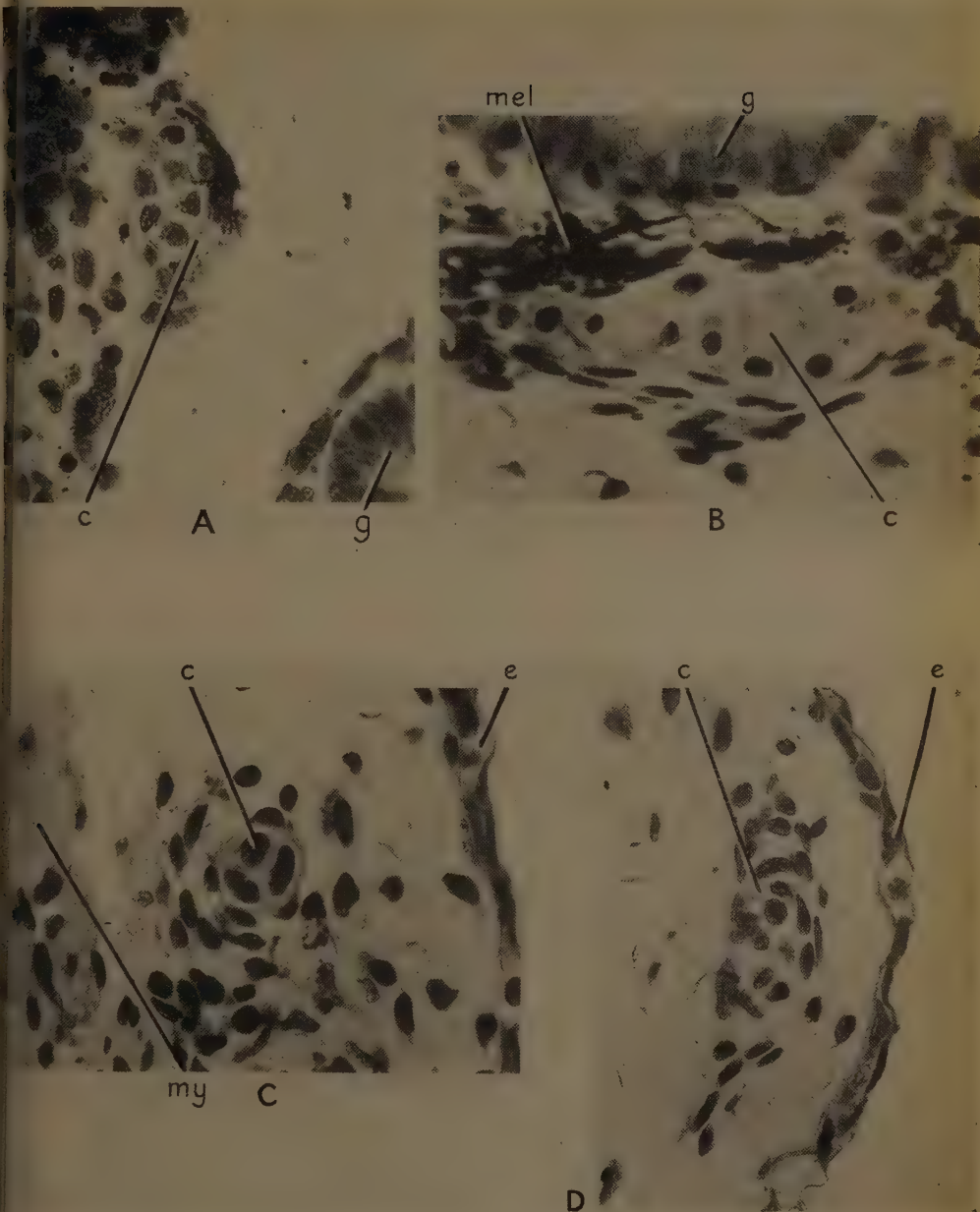
In most cases the graft sites were visible in the living animal as yellow patches due to concentrations of xanthophores of neural crest origin. In some cases the graft had encroached upon the fore-limb field and the limb on that side was then reduced in size or absent. The sections showed that the grafts had often had two further effects upon the host animals. In a number of cases the backward growth

of the pronephric duct had been blocked by the graft, and in even more cases the downward growth of the adjacent somites had been blocked. The hosts were not, apparently, otherwise seriously affected. The grafts themselves were in all cases alive and had differentiated into tissues that are known to be of neural crest origin. They were often associated with poorly differentiated but definite otic vesicles. It was impossible to tell whether these had been induced in the host ectoderm by the graft or were derived from it.

These results are summarized in Table 1. Since it was not always possible to say with certainty whether melanophores or mesenchyme cells were present in marked excess of the numbers to be expected in the region of the host in which the graft lay, in some cases the result has been queried.

It will be seen that in only 1 of the 11 younger animals and 5 of the 21 older ones was cartilage of graft origin present. In 1 of the 5 latter animals the cartilage was in the region of the host's pectoral girdle and it is perhaps not quite certain that it is of donor origin. Four of the six cases of cartilage formation are illustrated in the plate. This shows that the cartilages are small, and, indeed, very much smaller than the elements that correspond to the presumptive fate of the grafts.

The material provides little answer to the question of why only some of the grafts gave rise to cartilage. It is true that the largest and most fully differentiated piece of cartilage appeared closely associated with the gut (animal 12A, Plate, fig. B), and this seems to testify to the influence of the endoderm in promoting chondrification, as was suggested by Raven (1935) and later strongly emphasized by Hörstadius & Sellman. But that such an influence is not essential is shown by the other cases, in none of which is there evidence of contact between graft and endoderm. Nor does age alone seem to determine the formation or absence of cartilage, although the proportion of cases of cartilage formation is higher in the older group and the one case among the younger is, although definite, rather poorly differentiated. It is, of course, possible that had the host animals been allowed to live still longer all would have shown cartilages of graft origin, but if so we would be dealing with processes so far removed from the time-scale of the normal development of the chondrocranium that it would be unsafe to argue from them. On the other hand, it could be held, and the possibility is discussed by Hörstadius & Sellman, that chondrification is dependent upon the presence of some substance in surrounding tissues whose formation takes place earlier in anterior than posterior parts of the body. This would fit in with the normal development of the post-cranial skeleton which proceeds from before backwards. If this were true, then skeletogenous material grafted from the head to the trunk might be fully competent to form cartilage but still have to wait until the arrival of a 'wave of chondrification' passing down the animal. However, in many of the twenty-one older cases reported here the neural arches of the vertebrae at the level of the graft are chondrified although the graft is not, and it consequently seems unlikely that this explanation is a true one.



D. R. NEWTH

DISCUSSION

These results confirm the impression gained from earlier work on the subject that the determination of the cranial neural crest to form cartilage is not a simple process. Certain it is that the neural crest of the urodele head at the neural-plate stage does not, on transplantation to the flank, behave according to its presumptive fate. Were it to do so we should get large masses of cartilage of donor origin differentiating *pari passu* with the splanchnocranium of the host. Since we actually get only small pieces of cartilage, formed later than the host splanchnocranium, and then only in a small proportion of cases (where other factors are excluded), we cannot think here of a rigid determination and there is no doubt that Hörstadius & Sellman are right in stressing this fact. On the other hand, it must be conceded that some important phase in the determination of the skeletogenous component of the neural crest has been completed by the neural-plate stage, and this accounts for the special property which enables it to differentiate into cartilage under circumstances in which the rest of the neurula ectoderm will not.

SUMMARY

The neural folds of the Axolotl neurula transplanted homoplastically from the branchial region to the trunk give rise to cartilage in only a small proportion of cases, even where the grafts are allowed to live for very considerable periods. It is concluded that the determination of the skeletogenous component of the neural crest of the young neurula has proceeded some way, but that its cells are not yet rigidly bound to their presumptive fate.

It is a pleasure to acknowledge the help given to me by Dr. G. M. Truslove and Miss Doreen Thomason.

REFERENCES

- HÖRSTADIUS, S., & SELLMAN, S. (1946). Experimentelle Untersuchungen über die Determination des knorpeligen Kopfskelettes bei Urodelen. *Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis*, Ser. 4, **13**, 1-170.
- RAVEN, CHR. P. (1933). Zur Entwicklung der Ganglienleiste. II. Über das Differenzierungsvermögen des Kopfganglienleistenmaterials von Urodelen. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **129**, 179-98.
- (1935). Zur Entwicklung der Ganglienleiste. IV. Untersuchungen über Zeitpunkt und Verlauf der 'materiellen Determination' des präsumptiven Kopfganglienleistenmaterials der Urodelen. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **132**, 509-75.

EXPLANATION OF PLATE

FIG. A. The cartilage associated with the graft in animal 6B in section. ($\times 335$.)

FIG. B. The cartilage associated with the graft in animal 12A in section. ($\times 335$.)

FIG. C. The cartilage associated with the graft in animal 10c in section. ($\times 335$.)

FIG. D. The cartilage associated with the graft in animal 24A in section. ($\times 335$.)

Abbreviations used in plate: c, cartilage; e, epidermis; g, wall of gut; mel, melanophores; my, myotome.

Étude ultrastructurale de l'ectoblaste chez l'embryon d'Urodèle normal ou traité par l'urée

par J. GALLERA¹ et C. A. BAUD

Laboratoire de Morphologie ultrastructurale, Institut d'Anatomie, École de Médecine, Genève

AVEC UNE PLANCHE

INTRODUCTION

LES expériences de J. W. Jenkinson (1906) ont montré que l'exposition des embryons de Grenouille à l'action de solutions d'urée provoque une altération profonde du développement ontogénétique, en particulier par la formation d'îlots chordaux au sein des organes voisins de la chorde dorsale. Reprenant dans un travail récent ces expériences, J. Fautrez (1951) interprète le phénomène mentionné comme étant le résultat d'une diffusion de substances cytospécifiques, de la chorde dorsale vers les cellules atteintes. Cette diffusion de substances normalement peu ou pas diffusibles serait rendue possible par des modifications de perméabilité cellulaire provoquées par l'urée. En effet, l'action perméabilisante de l'urée est connue de longue date. Il est intéressant de noter que dans une étude récente F. Seemann (1953) arrive à la conclusion opposée: l'urée diminuerait la perméabilité cellulaire à l'eau. Il est à remarquer pourtant que le seul critère de la perméabilité adopté par cet auteur est la vitesse d'apparition et de disparition des phénomènes plasmolytiques dans les cellules végétales, ce qui nous paraît être une base trop étroite pour une étude du processus complexe de la perméabilité cellulaire. D'autre part cependant, Seemann arrive à la conclusion que L. Monné (1947) a tiré de ses recherches, à savoir que l'urée altère profondément la structure de toute la masse cytoplasmique de la cellule.

Il est bien connu que le feuillet externe des embryons d'Amphibiens n'est susceptible de réagir à l'action de l'inducteur que pendant une période déterminée et assez brève de son évolution. Cette réceptivité de l'ectoblaste est nommée 'compétence'. Partant de l'hypothèse que la disparition progressive des compétences cérebrogènes et sensorielles de l'ectoblaste est due, au moins partiellement, à une diminution progressive de la perméabilité de l'ectoblaste aux substances inductrices, J. Gallera (1953) a récemment effectué deux séries d'expériences sur les embryons de Triton: dans la première l'ectoblaste ventral des embryons normaux a été transplanté sur la voûte archentérique de jeunes

¹ Subventionné par le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique.

Authors' address: Ecole de Médecine, Université de Genève, Genève, Switzerland.

neurulas, dans la seconde série les greffons ont été prélevés chez des embryons traités préalablement par un mélange composé de solution de Holtfreter et de solution d'urée (1 volume de la solution de Holtfreter + 3 volumes d'urée à 1 pour cent). Le résultat de ces expériences a été très net: Les transplantats prélevés au début de la neurulation d'embryons élevés dans des conditions normales n'ont plus été aptes à construire du cerveau ni des organes des sens. Par contre, les greffons du même âge excisés chez des embryons cultivés durant toute la gastrulation dans la solution de Holtfreter additionnée d'urée ont été encore capables de bâtir un cerveau plus ou moins bien développé et les organes des sens correspondants.

Le problème que nous nous sommes posé dans le travail présent est de savoir quelles modifications apparaissent au cours de la gastrulation dans la structure cytoplasmique du feuillet externe, et d'autre part quelles sont les altérations de cette structure provoquées par l'urée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons étudié à l'aide du microscope polarisant et du microscope électronique des coupes de l'ectoblaste de *Pleurodeles Waltlii* prélevé sur des embryons normaux ou traités par l'urée.

Les embryons soumis à l'action de la solution d'urée à 0.75 pour cent sont cultivés dans ce milieu sans membrane vitelline, du stade de l'encoche blastoporale jusqu'au début de la neurulation, soit 29 heures. Dans ces conditions, l'invagination et l'extension de l'ectoblaste dorsal sont partiellement arrêtées: au moment de l'apparition du sillon médian et du liséré pigmenté, le blastopore est encore largement ouvert et muni d'un gros bouchon vitellin. Il est à mentionner que la distribution du pigment est fréquemment très irrégulière, les embryons étant comme tachetés. Malgré cette altération profonde du développement général, les greffons prélevés sur ces embryons et transplantés sur les neurulas normales peuvent se développer parfaitement.

De petits rectangles d'ectoblaste dorsal et ventral sont prélevés sur de jeunes gastrulas au stade de l'encoche blastoporale, et sur des embryons au début de la neurulation. Cet ectoblaste est fixé soit au formol (1 volume de formol + 4 volumes de mélange tampon), soit à l'acide osmique à 1 pour cent tamponné. Il est important pour le maintien des structures submicroscopiques que le pH du fixateur soit le même que celui du matériel fixé, comme l'a montré C. A. Baud (1953b). En ce qui concerne les Urodèles, on ne trouve dans la littérature que les résultats des mensurations du pH intracellulaire faites par F. J. J. Buytendijk & M. W. Woerdeman (1927) sur le *Triton taeniatus*. D'après ces auteurs le pH de l'ectoblaste de la gastrula est 7.6 et celui de la neurula de 6.9 à 7.0. Nos fixateurs sont tamponnés à 7.4 quand il s'agit de gastrulas et à 6.7 dans le cas des neurulas. Après une fixation de 24 heures, puis un passage très progressif par les alcools, l'inclusion est faite soit dans la paraffine soit dans la celloïdine-paraffine.

Les blocs ectoblastiques fixés au formol et inclus dans la paraffine sont coupés

longitudinalement; les coupes de 4μ d'épaisseur sont posées alternativement sur deux lames porte-objet: l'une est montée directement dans le Cedax, tandis que l'autre est préalablement colorée dans le mélange de pyronine et de vert de méthyle tamponné à 4.66.

Les coupes ultramincées (environ 0.1μ d'épaisseur), également longitudinales, destinées à l'étude au microscope électronique, sont faites avec le matériel fixé à l'acide osmique et inclus dans la celloïdine-paraffine.

L'observation des biréfringences, qui nécessite un microscope polarisant spécial muni d'un compensateur très sensible, se fait suivant la méthode antérieurement décrite par C. A. Baud (1948).

RÉSULTATS

(a) *Étude des constituants fondamentaux des cellules ectoblastiques*

Nos observations ont porté sur trois constituants des cellules ectoblastiques: le hyaloplasma, les plaquettes vitellines et les grains de pigment.

Le *hyaloplasma* présente dans certains cas, que nous indiquerons plus loin, une orientation des molécules protéiques de sa charpente. Cette disposition régulière, perpendiculaire à la surface de l'ectoblaste, se manifeste dans les préparations fixées et montées, par une légère biréfringence des travées hyaloplasmiques, positive par rapport à l'allongement de ces formations. Cette biréfringence, parfaitement reconnaissable sous le microscope polarisant, n'est malheureusement pas suffisamment forte pour apparaître nettement sur les microphotographies. Pour cette raison, des dessins légèrement schématisés sont joints à nos photos B et C; les stries cytoplasmiques biréfringentes sont marquées dans nos dessins par de minces traits noirs.

On connaît depuis longtemps la biréfringence du cytoplasme au tout premier stade du développement (voir à ce sujet en particulier le travail d'ensemble de W. J. Schmidt, 1941, et A. M. Dalcq, 1951). A des stades plus avancés, C. H. Waddington (1940, 1942) a observé une biréfringence du cytoplasme des cellules en bouteille qui s'invaginent au niveau de l'encoche blastoporale. Chez de jeunes embryons de Poulet, L. B. Hobson (1941), examinant *in vivo* sous le microscope polarisant la plaque et le tube neural, a pu constater que les membranes cellulaires et peut-être aussi le cytoplasme montrent une légère biréfringence positive par rapport au grand axe des cellules. Par contre R. G. Harrison, W. T. Astbury, & K. M. Rudall (1940) n'ont noté dans les gastrulas et les neurulas que la biréfringence des membranes cellulaires.

Les *plaquettes vitellines*, qui sont de forme ovale, sont biréfringentes négatives par rapport à leur allongement; elles sont en réalité constituées d'un empilement de bâtonnets biréfringents positifs, disposés perpendiculairement au grand axe des plaquettes. Chaque plaquette est entourée d'une mince membrane, biréfringente négative par rapport à la normale à la surface (Planche, fig. B); cette anisotropie optique est semblable à celle de la membrane nucléaire (cf. C. A.

Baud, 1953a), et correspond de même à une texture submicroscopique foliaire de ses constituants protéiques. Tandis que cette biréfringence de la membrane n'a jamais été observée jusqu'ici, celle de la plaquette vitelline elle-même a fait l'objet de mentions de la part de L. Radlkofer (1859), W. J. Schmidt (1924), et J. Holtfreter (1946b).

Les *grains de pigment* sont également visibles entre les nicols croisés, comme de minuscules taches brillantes arrondies; mais il s'agit ici d'une 'fausse biréfringence' (cf. C. A. Baud, 1953c) due aux phénomènes de réflexion totale de la lumière à l'interface entre les grains et le milieu qui les entoure. D'ailleurs, seuls les grains de mélanine de forme allongée peuvent être biréfringents, comme l'a montré W. J. Schmidt (1949). Au microscope électronique, les grains de pigment apparaissent effectivement sphériques dans notre matériel (Planche, fig. E).

(b) *Étude expérimentale de l'ultrastructure des cellules ectoblastiques*

Ectoblaste au début de la gastrulation. Les cellules du neurectoblaste présomptif, dont l'épaisseur atteint 120μ environ (Planche, fig. A), sont fortement allongées dans le sens dorso-ventral; leur face externe est légèrement bombée. Tout le corps cellulaire, sauf la couche corticale ou 'coat' de Holtfreter dont la zone profonde est farcie de grains de pigment, est rempli de plaquettes vitellines; sous le cortex on voit de petites plaquettes; dans les couches plus profondes, de petites et de grosses plaquettes sont mélangées sans ordre apparent. Les grains de pigment descendent le long des cloisons intercellulaires, souvent jusqu'à la face profonde de l'ectoblaste. Les minces travées cytoplasmiques qui séparent les plaquettes vitellines ont un aspect hyalin; aucune biréfringence n'y est détectable.

Ectoblaste normal d'une jeune neurula. La face externe du neurectoblaste et de l'épiblaste ventral est régulière et lisse. Les grains de pigment sont limités à la zone profonde de la couche corticale, et pénètrent plus ou moins profondément le long des cloisons intercellulaires. Les grosses plaquettes vitellines sont rassemblées dans la région basale des cellules. La plupart de ces plaquettes sont orientées avec leur grand axe parallèle à la face interne de l'ectoblaste; en revanche, les plaquettes situées plus superficiellement sont fréquemment orientées, surtout les petites, perpendiculairement à la surface, en formant de petits chapelets biréfringents négatifs.

La quantité de plaquettes vitellines, aussi bien dans le neurectoblaste que dans l'épiblaste ventral, est nettement diminuée par rapport à celle que l'on a constatée dans l'ectoblaste plus jeune. De larges plages de cytoplasme pur apparaissent entre les plaquettes vitellines. Dans le neurectoblaste, dont les cellules sont fortement allongées, ces plages occupent le tiers supérieur environ du corps cellulaire. Dans l'épiblaste ventral, aux cellules plus ou moins cubiques, la localisation de ces plages cytoplasmiques est moins régulière. Le cytoplasme est nettement orienté dans le sens dorso-ventral; au sein des plages mentionnées on voit des pinceaux de filaments biréfringents positifs; on peut aussi apercevoir ces filaments dans les travées cytoplasmiques entre les plaquettes vitellines.

L'orientation des grains de pigment en colonnettes verticales prouve que le cytoplasme superficiel a aussi une texture orientée. Il convient de souligner que cette texture orientée du cytoplasme est aussi bien visible dans le neurectoblaste (Planche, fig. B) que dans l'épiblaste ventral (Planche, fig. C); nous avons donc affaire à une modification générale de la structure cytoplasmique de l'ectoblaste. En particulier, c'est une modification complètement indépendante du processus d'allongement des cellules constituant la plaque neurale.

Ectoblaste des neurulas traitées préalablement par l'urée. Le neurectoblaste est plus épais et plus riche en plaquettes vitellines que celui des embryons normaux; l'épaisseur de ce dernier est de 44μ environ, tandis que le neurectoblaste des embryons traités par l'urée atteint 70μ . L'épaisseur anormale est la conséquence de l'inhibition partielle de l'extension de l'ectoblaste durant la gastrulation; la richesse en plaquettes vitellines est le résultat de l'arrêt de l'invagination, la plaque neurale étant constituée par un matériel plus postérieur que dans le cas du développement normal. Par conséquent, les plages de cytoplasme pur sont moins nombreuses et moins étendues que dans l'ectoblaste d'embryons normaux du même âge. Cependant, le fait le plus intéressant est que ce cytoplasme a un aspect nettement homogène, sans trace de filaments biréfringents; il n'y a pas non plus d'orientation des plaquettes vitellines. Il est à remarquer que de grosses plaquettes vitellines sont fréquemment situées directement sous le cortex (Planche, fig. D). D'autre part la disposition des grains de pigment est fort irrégulière (Planche, fig. D, à gauche).

La couche corticale est par endroits profondément altérée; c'est ce que montre l'observation au microscope électronique. Sur la coupe représentée à gauche de notre figure E de la Planche, le cortex a l'aspect normal et se présente sous la forme d'une mince couche plus homogène que le cytoplasme sous-jacent; on voit une cloison intercellulaire, et il est intéressant de noter qu'à ce niveau, contrairement à l'opinion de J. Holtfreter (1943, 1944, 1946a), la couche corticale est interrompue; nous avons observé le même phénomène dans plusieurs préparations. Sur la coupe figurée à droite de notre figure E, la structure caractéristique de la couche corticale est entièrement effacée sous l'action de l'urée.

DISCUSSION

L'ectoblaste embryonnaire ne prend l'aspect nettement épithélial que vers la fin de la gastrulation. Ce phénomène a peut-être pour conséquence une polarisation plus marquée des courants de diffusion de substances à travers les cellules, les surfaces d'échange se trouvant réduites. Cette polarisation, d'après les conceptions de A. W. Pollister (1941), serait à l'origine de l'orientation parallèle des chaînes moléculaires protéiques du hyaloplasma. Cette supposition semble renforcée par le fait que la plaque neurale de l'embryon traité par l'urée, bien que parfaitement identifiable par son relief, est composée de cellules moins allongées et à limites plus arrondies que celles de l'embryon normal, et ne présentant pas de hyaloplasma orienté biréfringent.

Les cellules ectoblastiques des neurulas traitées par l'urée présentent sensiblement le même aspect que les cellules ectoblastiques normales, mais plus jeunes, du début de la gastrulation, en particulier en ce qui concerne l'absence de hyaloplasma orienté biréfringent. Or nous savons que les transplants de l'ectoblaste âgé, mais traité par l'urée, se comportent à peu près de la même façon que ceux de l'ectoblaste normal plus jeune. Les modifications de l'ultrastructure se superposent donc aux modifications de compétence.

La texture non orientée de cet ectoblaste traité par l'urée semble d'autre part indiquer qu'il a gardé encore toute sa perméabilité primitive. En tous cas l'examen à l'aide du microscope électronique a montré que la structure de la couche corticale est profondément bouleversée. D'autre part, la présence de grosses plaquettes vitellines directement sous le cortex et la disposition irrégulière du pigment semblent indiquer que ce bouleversement a atteint tout le corps cellulaire.

RÉSUMÉ

La texture submicroscopique des plaquettes vitellines et de la membrane qui les entoure fait l'objet d'une description préliminaire, ainsi que celle du hyaloplasma.

L'ultrastructure du cytoplasme des cellules du neurectoblaste et de l'épiblaste ventral de jeunes neurulas est caractérisée par une nette orientation dorso-ventrale des constituants (hyaloplasma et plaquettes vitellines).

Après traitement par l'urée, les mêmes cellules ne présentent plus cette orientation, et ressemblent alors aux cellules ectoblastiques normales mais plus jeunes du début de la gastrulation.

Les modifications de l'ultrastructure se superposent aux modifications de compétence. L'origine de ces modifications morphologiques et fonctionnelles est discutée.

SUMMARY

A preliminary description is given of the submicroscopic texture of the yolk platelets and of the membrane which surrounds them, as also of that of the hyaloplasm.

The ultrastructure of the cytoplasm of neurectoblast cells and of ventral epiblast cells from young neurulas is characterized by an obvious dorso-ventral orientation of the constituents (hyaloplasm and yolk platelets).

After treatment with urea these cells no longer show this orientation, and they then resemble normal ectoblast cells, but of a younger stage, at the beginning of gastrulation.

The modifications of ultrastructure are correlated with modifications of competence. The origin of these morphological and functional modifications is discussed.

TRAVAUX CITÉS

- BAUD, C. A. (1948). Les techniques d'étude des structures inframicroscopiques. 4. L'observation de la biréfringence. *Bull. Soc. linn. Lyon*, **17**, 200-2.
- (1953a). Recherches sur la structure de la membrane nucléaire. *Acta Anat.* **17**, 113-74.
- (1953b). Action des variations de pH du fixateur sur les structures observables au microscope électronique. *C. R. Ass. Anat.* **40**, 223-7.
- (1953c). La fausse biréfringence. *Bull. Micr. appl.* **3**, 163-5.
- BUYTENDIJK, F. J. J., & WOERDEMAN, M. W. (1927). Die physico-chemischen Erscheinungen während der Entwicklung. 1. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **112**, 387-410.
- DALCQ, A. M. (1951). New descriptive and experimental data concerning the mammalian egg, principally of the rat. *Proc. Acad. Sci. Amst., Series C*, **54**, 351-72, 469-79.
- FAUTREZ, J. (1951). L'action de l'urée sur le développement embryonnaire de *Rana temporaria*. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **62**, 197-307.
- GALLERA, J. (1953). L'action de l'urée sur les compétences cérébrogènes et sensorielles de l'ectoblaste. *Rev. suisse Zool.* **60**, 547-66.
- HARRISON, R. G., ASTBURY, W. T., & RUDALL, K. M. (1940). An attempt at an X-ray analysis of embryonic processes. *J. exp. Zool.* **85**, 339-63.
- HOBSON, L. B. (1941). On the ultrastructure in the neural plate and tube of the early chick embryo, with notes on the effects of dehydration. *J. exp. Zool.* **88**, 107-34.
- HOLTFRETER, J. (1943). Properties and functions of the surface coat in amphibian embryos. *J. exp. Zool.* **93**, 251-323.
- (1944). Neural differentiation of ectoderm through exposure to saline solution. *J. exp. Zool.* **95**, 307-43.
- (1946a). Structure, motility and locomotion in isolated embryonic amphibian cells. *J. Morph.* **79**, 27-62.
- (1946b). Experiments on the formed inclusions of the amphibian egg. III. Observations on microsomes, vacuoles, and on the process of yolk resorption. *J. exp. Zool.* **103**, 81-112.
- JENKINSON, J. W. (1906). On the effect of certain solutions upon the development of the Frog's egg. *Arch. EntwMech. Org.* **21**, 367-460.
- MONNÉ, L. (1947). The action of narcotics and of hydrating and dehydrating agents on the structure of the cytoplasm. *Ark. Zool.* **39A**, No. 7, 1-32.
- POLLISTER, A. W. (1941). Mitochondrial orientations and molecular patterns. *Physiol. Zool.* **14**, 268-79.
- RADLKOFER, L. (1859). *Über Krystalle proteinartiger Körper pflanzlichen und thierischen Ursprungs*. Leipzig.
- SCHMIDT, W. J. (1924). *Die Bausteine des Tierkörpers in polarisiertem Lichte*. Bonn.
- (1941). Die Doppelbrechung des Protoplasmas und ihre Bedeutung für die Erforschung seines submikroskopischen Baues. *Ergebn. Physiol.* **44**, 27-95.
- (1949). Altes und Neues über Strukturfarben im Tierreich. *Giessener naturwiss. Vorträge*, **6**, 1-71.
- SEEMANN, F. (1953). Der Einfluss von Neutralsalzen und Nichtleitern auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. *Protoplasma*, **42**, 109-32.
- WADDINGTON, C. H. (1940). *Organisers and genes*. Cambridge: The University Press.
- (1942). Observations on the forces of morphogenesis in the amphibian embryo. *J. exp. Biol.* **19**, 284-93.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Embryons de *Pleurodeles Waltlii*. Coupes longitudinales.

FIG. A. Ectoblaste dorsal au début de la gastrulation. Coupe de 4μ d'épaisseur, colorée dans le mélange de pyronine et de vert de méthyle. Microphotographie en contraste de phase positif. Grossissement 490 $\times$.

FIG. B. Plaque neurale au stade du liséré pigmenté. Coupe de 4μ d'épaisseur. Nicols croisés (direction de vibration des nicols à 45° par rapport aux bords de l'image), compensateur de



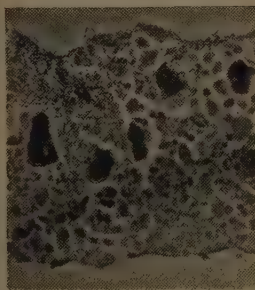
A



B



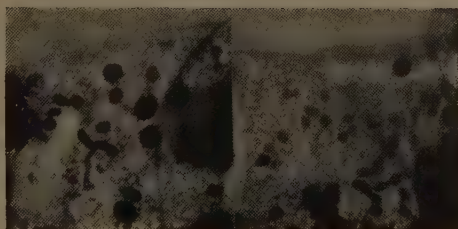
C



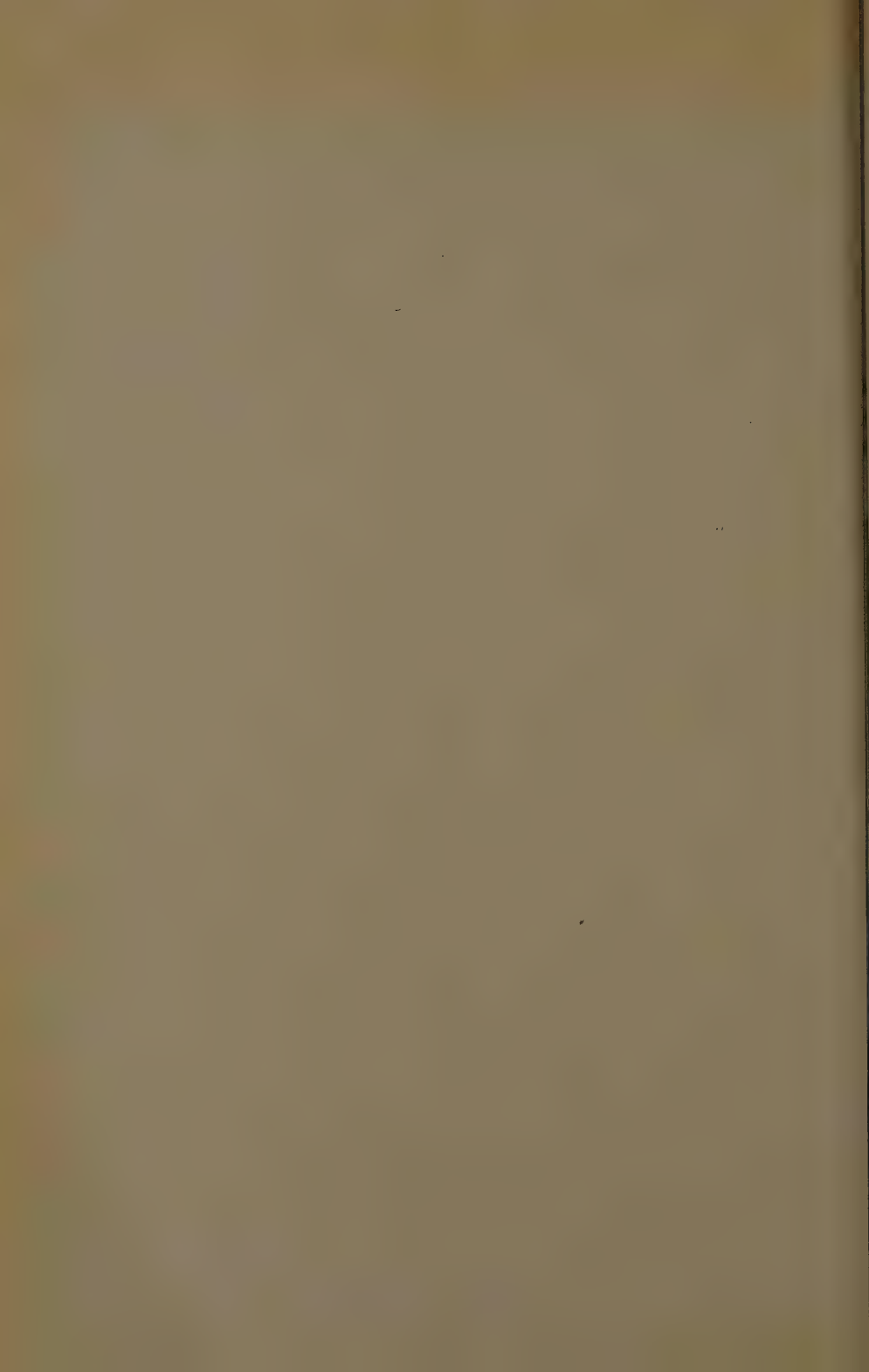
D



E



J. GALLERA & C. A. BAUD



Köhler interposé et orienté de telle façon que les structures observées sont en position d'addition (claires) lorsque la direction de leur grand indice est parallèle au bord inférieur de l'image. *A gauche*, schéma explicatif montrant le hyaloplasma orienté (en traits fins), les plaquettes vitellines et leurs membranes, et au centre un noyau de forme caractéristique. Grossissement 910 $\times$.

FIG. C. Épiblaste ventral d'un embryon du même âge que celui de la figure précédente, et photographié dans les mêmes conditions. *A gauche*, schéma explicatif. Grossissement 910 $\times$.

FIG. D. Plaque neurale au stade du liséré pigmenté, chez un embryon traité par l'urée. Conditions d'observation comme dans la figure 1. Grossissement 490 $\times$.

FIG. E. Plaque neurale au stade du liséré pigmenté, chez un embryon traité par l'urée. Coupes de 0.1μ d'épaisseur. Micrographies électroniques, 7,250 $\times$. A remarquer: la forme arrondie des grains de pigment; à *gauche*, la couche corticale bien visible, avec la cloison intercellulaire qui l'interrompt; sur la figure *de droite*, la structure de la couche corticale est effacée.

The Effect of Cortisone on Cell Proliferation and Migration in Peripheral Nerves undergoing Wallerian degeneration

by G. A. THOMAS¹

From the Department of Anatomy, Guy's Hospital Medical School, London

INTRODUCTION

THE effect of cortisone on the proliferation of tissues other than mesenchymal has received little attention. Bullough (1952) showed that cortisone had a marked effect on the mitotic activity of the epidermis in mice, and Leroy (1952) showed a similar effect on immature testes of rats, but no effect on mature ones. McColl & Weston (1953) have studied the influence of cortisone on the process of Wallerian degeneration in peripheral nerve and noted that there was less total cellularity in degenerated nerves from cortisone-treated animals.

It was thought useful to undertake a quantitative study of proliferation during Wallerian degeneration in peripheral nerves from cortisone-treated animals because the normal changes in nuclear population during this process have been intensively investigated (Abercrombie & Johnson, 1946; Thomas, 1948), and it is known that different types of cells multiply at different rates. The examination of the simultaneous action of a given dose of cortisone on these different types of cells should be interesting, particularly as some (the Schwann cells) are of ectodermal origin and others (endothelium and smooth muscle of blood-vessels, and perhaps endoneurial and perineurial connective tissue) are of mesodermal origin.

The nerve to the medial head of the gastrocnemius muscle in the rabbit was used. Two aspects of Wallerian degeneration were chosen for study: the increase of population in the degenerating nerve *in vivo* and the outwandering activity of the cells from the nerve *in vitro*. While the outwandering of cells *in vitro* is certainly closely connected with the proliferation of cells within the nerve, it is possible that these two processes may be affected independently by cortisone.

MATERIAL AND METHODS

Adult albino rabbits of both sexes were used as experimental animals. Daily intramuscular injections of 10 mg. of 'cortone' Merck (a suspension of crystalline cortisone acetate) were begun 2 days before operation (or before removal of

¹ *Author's address:* Guy's Hospital Medical School, London, S.E.1, U.K.

undegenerated nerves) and continued until the animal was killed. At operation under nembutal and ether anaesthesia the sciatic nerve on one side was divided aseptically in the thigh region. On division the elasticity of the tissues causes sufficient retraction of the cut ends from each other to prevent reinnervation of the peripheral stump during the short period for which these experiments continued. Prevention of reinnervation is important since it has been shown (Abercrombie, Johnson, & Thomas, 1949) that reinnervation considerably depresses Schwann-cell outwandering. Control animals (not cortisone-treated) were always operated on at the same time as the cortisone-treated animals.

After various periods of time the animals were killed and pieces of the sciatic nerve removed. Some of these pieces were fixed and others were cultured *in vitro*.

Histological technique

The fixatives used were Heidenhain's 'Susa' and Bouin. The lengths of nerve were lightly stretched on pieces of card before being put in the fixative. This prevents the distortion which often otherwise occurs. The nerves were embedded in paraffin and transverse and longitudinal sections of 7μ were cut. These were stained by Lillie's modification of Masson's trichrome stain.

Transverse sections only have been used for counting the nuclear population. To determine any effect of cortisone on the total nuclear population, total counts, i.e. counts of all the nuclei visible in one transverse section of the nerve, were made. To detect any differential effect that the cortisone may have, the nuclei of different kinds of cells have been counted separately as far as practicable. Three categories of cells have been analysed—endoneurial, tubal, and blood-vessel cells. The endoneurial cells include fibroblasts and macrophages; the tubal cells include Schwann cells and macrophages; and the blood-vessel cells include smooth muscle and endothelial cells. Although it would be extremely desirable, it has been found impossible to differentiate between Schwann cells and macrophages in the Schwann tubes, but vitally-stained preparations indicate that in relation to the whole tubal population the macrophage invasion is small (Abercrombie, personal communication).

It is usual to average the counts of three complete sections selected at random from each nerve. The necessity for standardizing the nuclear counts for alteration during degeneration in the volume of the whole nerve and in the average length of nuclei was pointed out by Abercrombie & Johnson (1946). Their methods have been applied in the present paper. When counts of all the nuclei in a transverse section of the nerve have been made there is no need to standardize for changes in the volume of the nerve, since any such changes in volume will not affect the total number of nuclei present. The method for allowing for changes in nuclear length was that used by Abercrombie & Johnson (1946), except that the average nuclear length in longitudinal section for each period of degeneration was obtained from a sample of the nerves degenerated for that length of time. It has already been shown (Thomas, 1948) that the small amount of stretching

involved in fixing the nerve to a piece of card before immersion in the fixative is unimportant. The amount of shortening of nuclei in the cortisone-treated nerve and in the control nerve was the same, and was similar to that found in earlier studies (Abercrombie & Johnson, 1946; Thomas, 1948). The figures obtained from measurements of nuclear length were used to correct the 'raw' nuclear counts. Estimations of the statistical significance of differences between means have been made by the *t* test, the level of significance used for a conclusion that the samples concerned do not come from the same population being a probability (*p*) that they do so of 0.01. When the probability is between 0.05 and 0.01 this is regarded as being possibly significant.

Tissue-culture technique

At operation, lengths of the sciatic nerve of cortisone-treated and control animals were removed aseptically and placed in Pannett and Compton's saline. The n. gastrocnemii medialis was dissected out of the sciatic nerve under a binocular microscope, the epineurium being removed. The nerve was divided into 6–10 explants of the whole width and about 1 mm. length and explanted in hanging drop cultures. Six cortisone-treated and 6 control animals were studied at each time of degeneration. The culture medium consisted of fowl plasma and 8-day chick embryo extract. In each drop one explant from a cortisone-treated animal and one from a control animal of the same period of degeneration were set up. The cultures were incubated for 3 days at 38° C. and then fixed in formol saline and stained in Harris's haematoxylin.

After fixation and staining the nuclei of Schwann cells, fibroblasts, and macrophages were counted under the microscope. The validity of the counting technique has been discussed by Abercrombie, Johnson, & Thomas (1949) and no amplification is necessary here.

RESULTS

The effect of cortisone on nuclear population

In Table 1 the mean number of nuclei in a complete transverse section of the n. gastrocnemii medialis after different periods of degeneration, corrected for changes in nuclear length, are shown. The figures are expressed both as absolute numbers of nuclei and as percentages of the mean total number of nuclei in undegenerated nerves.

The numbers of nuclei in the control nerves increase during degeneration as earlier described by Thomas (1948). The numbers of nuclei in the nerves from animals treated with cortisone also increase, but at all times they are significantly fewer than those in the control nerves. As the period of degeneration is made longer, the depression of nuclear population in the cortisone-treated nerves becomes somewhat less. Thus after 10 days of degeneration the number of nuclei in the control nerves is 2.7 times the number in a cortisone-treated nerve, while after 25 days of degeneration the corresponding figure has fallen to 2.0.

TABLE 1

Mean population with standard errors of all nuclei of nerves after different periods of degeneration in cortisone-treated and control animals

Days of degeneration	Cortisone			Control		
	No. of animals	No. of nuclei	No. of nuclei as % of 0 days	No. of animals	No. of nuclei	No. of nuclei as % of 0 days
0	6	48±8	100	6	44±7	100
10	6	114±17	235	6	279±23	634
20	6	256±35	533	6	515±43	1,170
25	4	376±47	780	4	685±55	1,557

The influence of cortisone on the proliferation of different cell types

In order to discover the effect of cortisone on the different types of cell present, the nuclei have been divided into three categories—tubal nuclei (i.e. those which lie within the Schwann tubes), endoneurial connective tissue nuclei, and nuclei of the blood-vessel wall. The figures obtained for each type have been standardized for changes in mean nuclear length of all types during degeneration.

TABLE 2

Mean populations of tubal, endoneurial connective tissue, and blood-vessel wall nuclei in nerves from cortisone-treated and control animals

Days of degeneration	Cortisone			Control		
	Tubal	Endo.	B.V.	Tubal	Endo.	B.V.
0	20±3	24±3	4±1	18±6	21±6	5±1
10	45±7	47±6	10±2	192±15	69±13	18±3
20	189±14	52±12	10±3	408±41	86±12	21±4
25	296±26	70±16	10±3	550±52	111±18	24±4

Table 2 shows the numbers of the three types of nuclei at different times after nerve section in cortisone-treated and in control animals. In Table 3 these figures are expressed as percentages of the number of nuclei in an undegenerated nerve. In Table 4 the number of nuclei in the nerves of cortisone-treated animals has been expressed as a percentage of the number of nuclei in the nerves of corresponding control animals.

Tubal nuclei. As can be seen from Tables 2 and 3, the numbers of nuclei within the Schwann tubes after each period of degeneration is significantly less in cortisone-treated animals than in the control group. Table 4 shows that the amount of depression in these nuclear populations is greatest after 10 days of degeneration, when the number of tubal nuclei in the degenerated nerve from a

cortisone-treated animal is only 21 per cent. of that in a control animal. As the length of degeneration increases this depression becomes less marked. The striking depression of the tubal nuclear population after 10 days of degeneration is probably due to two factors: a depression of the proliferation of the Schwann cells, together with a depression of the invasion of the Schwann tubes by macrophages and their subsequent proliferation. The part played by the macrophages will be discussed later.

TABLE 3

Mean populations of tubal, endoneurial connective tissue, and blood-vessel wall nuclei in nerves from cortisone-treated and control animals expressed as percentages of the undegenerated population

Days of degeneration	Cortisone			Control		
	Tubal	Endo.	B.V.	Tubal	Endo.	B.V.
0	100	100	100	100	100	100
10	225	196	250	1,067	329	360
20	945	217	250	2,267	409	420
25	1,480	291	250	3,056	528	480

TABLE 4

Number of nuclei in nerves of rabbits treated with cortisone expressed as a percentage of the number of nuclei in control nerves of untreated rabbits. The differences in the undegenerated nerves are not significant

Days of degeneration	Tubal	Endoneurial	Blood-vessel
0	111	114	125
10	21	60	69
20	42	53	53
25	48	55	47

Endoneurial nuclei. It can be seen from Tables 2 and 3 that the proliferation of endoneurial connective tissue cells has been affected by the administration of cortisone, but that the depression of the proliferation of these cells is much less than the depression of tubal nuclei. The maximum depression occurs after 20 days of degeneration, unlike that of the tubal nuclear population which occurs after 10 days. At 20 days of degeneration only 53 per cent. of the control population of endoneurial cells is present in the degenerating nerves from cortisone-treated animals.

As when considering the tubal nuclear population, it must be borne in mind that some of the depression in the number of endoneurial connective tissue nuclei

may be due to an inhibition of the multiplication of macrophages in the tissues, since these cells have not been distinguished from fibroblasts.

Nuclei of the blood-vessel wall. Tables 2 and 3 show that the smooth muscle and endothelial cells of blood-vessel walls multiply less ($p < 0.05$ at each time) in degenerating nerves from cortisone-treated animals than in normal animals. This depression of proliferation is similar in extent to that found in the endoneurial cells.

TABLE 5

Mean numbers of cells outwandering from explants of degenerating cortisone-treated and control nerves in tissue culture

Days of degeneration	Cortisone			Control		
	Schwann	Fibroblasts	Wandering cells	Schwann	Fibroblasts	Wandering cells
0	0	0	1	0	0	0
10	32±9	38±12	5±2	65±16	76±19	39±15
20	131±21	105±20	33±6	207±27	181±29	69±20

Tissue culture

Table 5 shows the number of cells outwandering from explants of degenerating n. gastrocnemii medialis at 0, 10, and 20 days after section of the nerves. After each period of degeneration the number of Schwann cells, fibroblasts, and wandering cells which migrate from the explant after 3 days of incubation is probably significantly less ($p < 0.05$) in nerves taken from animals receiving cortisone than in control nerves. When all the data is taken together, the significance of the difference is undoubted.

After 10 days' degeneration explants of nerves from cortisone-treated animals produce only half as many Schwann cells and fibroblasts as the control nerves. After 20 days the depression in the nerves from cortisone-treated animals is still evident, but is less than it was at 10 days. The number of wandering cells migrating from the explants is more variable. After 10 days' degeneration cortisone has caused a reduction in the number of migrating cells to one-third, and after 20 days there are slightly less than half the number of cells migrating from nerves from cortisone-treated animals compared with controls.

DISCUSSION

These results indicate that cortisone has a considerable effect in suppressing the proliferation of all types of cells in a peripheral nerve undergoing Wallerian degeneration. As suggested earlier, it is possible that this depression in the nuclear populations in the Schwann tubes of degenerating nerves is due to a certain extent to a depression in numbers of the macrophages which are normally present and which migrate into the Schwann tubes. That the depression of tubal nuclear population is largely due to this factor is unlikely for the following

reasons. If the absence of macrophages from the Schwann tubes accounts for the depression in the tubal nuclear population, macrophages in the normal degenerating nerve must account for at least 79 per cent. of the population of these tubes after 10 days' degeneration. Vital staining with trypan blue suggests, however, that this is unlikely (Abercrombie, personal communication). Together with the results of Bullough (1952) these results indicate clearly that the mitosis of cells of ectodermal origin is affected at least as much by cortisone as is that of the cells of mesodermally derived tissue. The inhibiting effect of cortisone on the proliferation of mesodermally derived connective tissue and smooth muscle-cells of nerve is actually less striking than that on the cells within the Schwann tubes.

The reasons for the depression of cell proliferation in tissues from cortisone-treated animals have been discussed by Billingham *et al.* (1951), who suggested that it was due to an inadequate blood-supply, though they did not deny the possibility of a direct action on the cells by cortisone. Bullough (1952) suggested that the fall in the epidermal mitotic rate in mice which occurs during treatment with cortisone was due to some interference in carbohydrate metabolism, which results in the inhibition of the energy-production necessary for the development of mitosis. That it is some general effect is in accord with the results reported here, in that all the cells studied showed a fall in their mitotic rate. It is clear that the three groups of cells studied do not behave in an identical way after all the periods of degeneration which were studied, but the general pattern of multiplication is sufficiently similar in each of the three groups to suggest that the same stimulus is acting on each. It is, of course, only to be expected that there will be minor differences in the proliferation pattern of groups of cells as different from each other as those being discussed here.

The observation that fewer cells migrate from tissue cultures of nerves from cortisone-treated animals than from those of control-degenerated nerves is to some extent in accord with the results of Abercrombie & Johnson (1942 and 1946), who show that during Wallerian degeneration there is a relation between the number of cells in a degenerating nerve and the number migrating from such a nerve in tissue culture, though changes in migratory ability of cells probably also occur. In the present results the smaller outwandering from nerves of cortisone-treated animals can be entirely accounted for by differences in the number of cells in the explant, so that it is not demonstrated that cortisone has any effect on the ability of cells in tissue culture to migrate.

SUMMARY

1. The administration of 10 mg. of cortisone per day to rabbits caused a depression in the proliferation of all the cells in nerves undergoing Wallerian degeneration.
2. The increase in numbers of cells within Schwann tubes was most affected,

that of the endoneurial connective tissue cells and of the cells of the blood-vessel wall less.

3. A greater depression of population occurred at the 10th day of degeneration than at the 20th or 25th.

4. *In vitro* fewer cells migrated from explants of degenerating peripheral nerves from animals receiving cortisone than from degenerating nerves from control animals, but the difference is accounted for by different numbers of cells in the explants.

My sincere thanks are due to Professor James Whillis and Dr. J. Joseph for criticism of this manuscript and to the Medical Research Council for the supply of cortisone used in these experiments.

REFERENCES

- ABERCROMBIE, M., & JOHNSON, M. L. (1942). The outwandering of cells in tissue cultures of nerves undergoing Wallerian degeneration. *J. exp. Biol.* **19**, 266-83.
- (1946). Quantitative histology of Wallerian degeneration. I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve. *J. Anat., Lond.* **80**, 37-50.
- & THOMAS, G. A. (1949). The influence of nerve fibres on Schwann-cell migration investigated in tissue culture. *Proc. roy. Soc. B*, **136**, 448-60.
- BILLINGHAM, R. E., KROHN, P. L., & MEDAWAR, P. B. (1951). Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *Brit. med. J.* **1**, 1157-63.
- BULLOUGH, W. S. (1952). Stress and epidermal mitotic activity. I. The effects of the adrenal hormones. *J. Endocrinol.* **8**, 265-74.
- LEROY, P. (1952). The effect of cortisone on the testes of adult and immature rats. *Anat. Rec.* **113**, 590.
- MCCOLL, J. D., & WESTON, J. K. (1953). The effect of cortisone on peripheral nerve during Wallerian degeneration. *Rev. canad. Biol.* **12**, 68-76.
- THOMAS, G. A. (1948). Quantitative histology of Wallerian degeneration. II. Nuclear population in two nerves of different fibre spectrum. *J. Anat., Lond.* **82**, 135-45.

Les effets de la centrifugation sur la blastula et la jeune gastrula des Amphibiens

III. Interactions entre ébauches primaires et secondaires

IV. Discussion générale et conclusions

par J. PASTEELS¹

Université de Bruxelles, Laboratoire d'Embryologie de la Faculté de Médecine

AVEC UNE PLANCHE

III. Interactions entre ébauches primaires et secondaires

INTRODUCTION

NOUS avons montré dans les deux premiers mémoires de cette série que la centrifugation aux stades blastula et jeune gastrula peut provoquer une *activation de l'ectoblaste*; c'est à dire que sans aucune intervention d'un inducteur éventuel, l'ectoblaste constitue des tissus nerveux et neuroïdes, de la chorde, des somites, du pronéphros. Le caractère autonome de cette activité a pu être démontré par des expériences d'explantations (Pasteels, 1953a, p. 15) ou de greffes, soit homoplastiques (Pasteels, 1953a, p. 16), soit hétéroplastiques (Pasteels, 1953a, p. 17).

La sensibilité de l'ectoblaste vis-à-vis de la centrifugation varie cependant suivant les espèces, et pour la même espèce, suivant l'âge du développement (Pasteels, 1953b).

C'est ainsi que chez des espèces peu sensibles comme l'Axolotl ou *Amblystoma punctatum*, ou encore à des stades peu sensibles chez *Rana temporaria* ou *Xenopus laevis*, l'activation de l'ectoblaste ne dépasse pas un stade subliminal. Dans ce cas, elle ne peut s'exprimer de façon autonome, c'est-à-dire après isolement et culture in vitro, mais lorsque cet ectoblaste sensibilisé se met au contact d'un inducteur normal, ses prestations dépassent celles du développement normal, et il se forme ainsi des vésicules neurales surnuméraires, ou des fragments de chorde inclus dans le névraxe (Pasteels, 1953a, p. 18, 1953b, pp. 128 et 129). Sur ce point, nous n'aurons à revenir que dans nos conclusions générales.

Il n'en est pas de même pour la véritable activation autonome, réalisée aux

¹ Author's address: Laboratoire d'Embryologie, Faculté de Médecine de l'Université, 97, rue aux Laines, Bruxelles, Belgium.

stades sensibles (blastula avancée et jeune gastrula chez la Grenouille, blastula chez le Xénope, jeune gastrula chez le Pleurodèle). Nous avons vu (Pasteels, 1953a, p. 18) que l'isolement de l'ectoblaste activé, et sa culture *in vitro* ne mène qu'à l'obtention de *tissus* neuraux, chordaux, mésoblastiques, et non à la formation de véritables organes, encore moins de systèmes axiaux. Ceux-ci dépendent de l'axe primaire de l'hôte, soit qu'ils soient laissés en place dans l'embryon centrifugé, ou qu'ils aient été greffés dans un hôte normal.

Dans ces conditions, on obtient des axes secondaires, à caractère exclusivement chordencéphalique et tronco-caudal, dont les constituants sont mal équilibrés; c'est tantôt la chorde, tantôt le mésoblaste, plus souvent le névraxe qui se trouvent en excès. Les monstres qui en résultent sont très semblables à ceux qui sont obtenus sous l'effet d'un inducteur hétérogène, par exemple du rein de Cobaye, tué par l'alcool, dans les expériences de Toivonen (1940).

Comme dans ces cas d'inductions hétérogènes, l'«embryon secondaire» se met en relation avec les ébauches primaires de l'embryon et il en résulte ainsi une interaction morphogénétique entre les deux systèmes. Nous avons déjà analysé l'influence de l'«hôte» sur les ébauches secondaires (cf. Pasteels, 1953a, p. 18). Reste à considérer la relation inverse: l'influence morphogénétique des complexes issus de l'ectoblaste isolé sur les organes primaires de l'embryon. C'est ce que nous envisagerons dans cette troisième partie.

RÉSULTATS. 1. GREFFES XÉNOPLASTIQUES

Les effets de l'ectoblaste activé de Rana temporaria greffé sur la gastrula normale de Triturus helveticus

Il s'agit d'expériences dont le type a été décrit à la page 17 (Fig. 9) de notre premier mémoire (Pasteels, 1953a). L'ectoblaste de *Rana* a été prélevé immédiatement après la centrifugation et greffé sur la région ventro-animale de jeunes gastrulas de Triton.

1. Exp. 1949 VIII-5. La greffe est placée dans la voûte du blastocoele, un peu ventralement par rapport au pôle animal. L'embryon est fixé six jours après l'opération: on y voit sur la région abdominale gauche une grosse enclave de tissu fortement pigmenté de *Rana*, et immédiatement à son contact un appendice caudiforme, à pigmentation claire, caractéristique du Triton (Fig. 1a). Sur coupes (Fig. 1b et 1c) on aperçoit que le tissu greffé de Grenouille a édifié un rhombencéphale, un otocyste, de la chorde, des somites, ainsi que, au contact de la masse vitelline de Triton, un proctodaeum. Les tissus ambiants de l'hôte (Triton) se sont incorporés de diverses façons dans ce petit système secondaire. En divers points du rhombencéphale, des cellules de l'hôte se sont jointes au tissu de Grenouille; il en résulte notamment un petit rhombencéphale accessoire, constitué par du tissu de Triton, accompagné par un petit otocyste et qui se prolonge par une moelle dans la saillie caudiforme. Celle-ci contient en outre un prolongement de la chorde de *Rana*. Les tissus de Triton ont constitué également

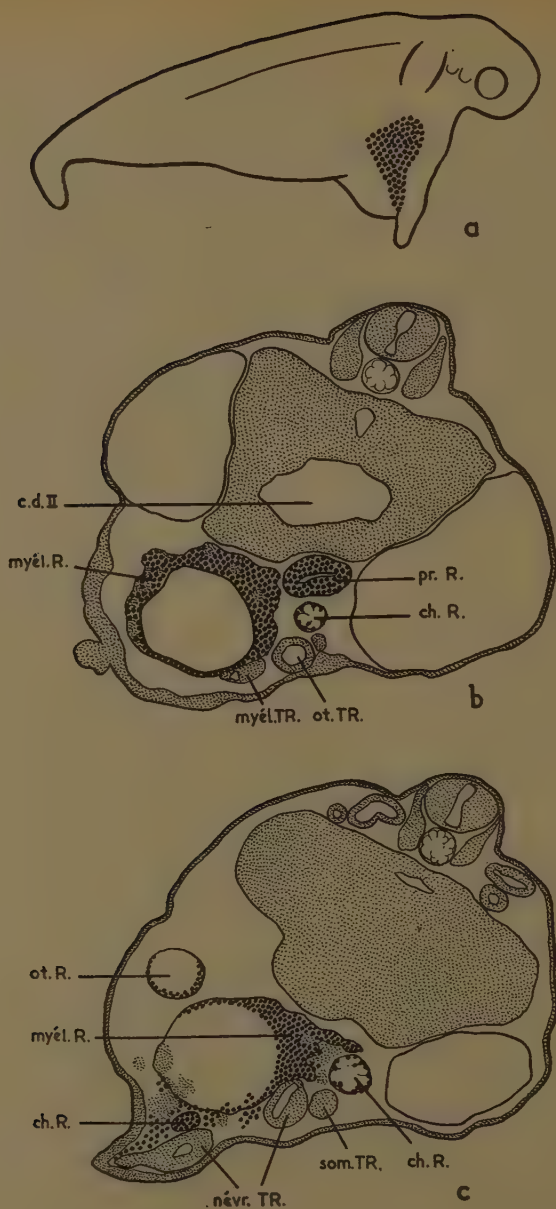


FIG. 1. Greffe d'ectoblaste centrifugé de *Rana temporaria* sur une gastrula normale de *Triturus helveticus*. (a) Vue de l'embryon in toto au moment de la fixation. (b) et (c) Deux coupes successives passant par la greffe; les tissus de *Rana* sont indiqués par un pointillé épais. c. d. II, cavité digestive secondaire; ch. R., chorde de *Rana*; myél. R., myélenképhale de *Rana*; myél. TR., myélenképhale de *Triton*; névr. TR., névraxe de *Triton*; ot. R., otocyste de *Rana*; ot. TR., otocyste de *Triton*; pr. R., pronephros de *Rana*; som. TR., somite de *Triton*.

un petit amas de somites. Enfin, au contact de ce système axial accessoire en chimère, s'est creusée dans la masse vitelline de l'hôte une cavité digestive assez vaste, mais sans poches branchiales. Conclusion: il s'agit visiblement dans ce cas d'une induction assimilatrice exercée par le greffon sur l'ectoblaste, peut-être le mésoblaste et l'endoblaste de l'hôte.

2. Exp. 1949 VIII-11. L'opération est analogue à la précédente. L'embryon est fixé au 6^e jour et montre une saillie dans la région cardiaque. Sur coupes (Fig. 2b et 2c) on voit que la greffe de *Rana* a produit une masse dans laquelle un tissu

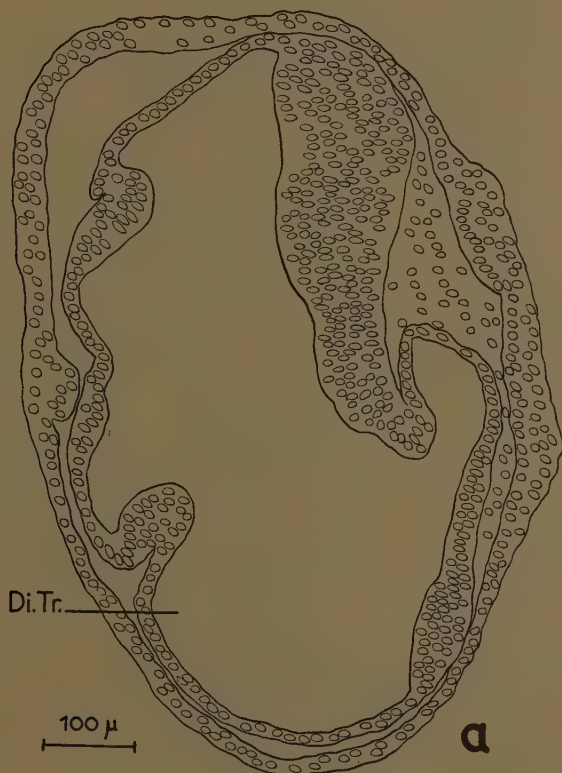


FIG. 2a

nerveux de caractère spino-chordencéphalique se mêle à du tissu chordal; on y trouve aussi un peu de myoblaste. L'hôte a réagi (Fig. 2 a et b) en constituant une expansion surnuméraire du diencéphale qui se prolonge jusqu'à la partie ventrale de la tête, et vient s'y mettre en contact avec l'explantat. Commentaires: ce cas explique la communication fréquente entre le cerveau primaire et l'ébauche

secondaire. Il s'agit d'un 'effet de pont', visible également sur la Fig. 9, p. 17 de notre premier mémoire (Pasteels, 1953a). Il y a eu, dans l'*ectoblaste de l'hôte*, une élévation du potentiel morphogénétique, produisant une extension du champ d'induction primaire jusqu'au contact du tissu greffé. Nous retiendrons le *caractère peu spécifique de la réaction*: le tissu greffé est spinal et chordencéphalique et il s'est produit une extension du diencéphale primaire.



FIG. 2b



FIG. 2c

FIG. 2. Greffe d'ectoblaste centrifugé de *Rana temporaria* sur une gastrula normale de *Triturus helveticus*. a, b, c. Trois coupes successives. Ch. R., chorde de *Rana*; Di. Tr., diencephale (en excès) de Triton; Myobl. R., myoblastes de *Rana*; Nerv. R., névraxe de *Rana*.

3. Exp. 1949 VIII-8. La greffe est analogue à celle des expériences précédentes: un fragment de voûte blastocoelienne d'un œuf de *Rana* fraîchement centrifugé est placé près du pôle animal d'une gastrula de Triton, ventralement et un peu à droite (Fig. 3a). Le lendemain, l'hôte montre une plaque médullaire

normale et le fragment implanté se voit en surface, sur le côté droit de la tête; il n'existe à ce stade aucune connexion entre le tissu greffé et la plaque médullaire de l'hôte, qui est toujours normale (Fig. 3b). Le surlendemain cependant la gouttière médullaire de l'hôte envoie un prolongement qui rejoint la greffe; celle-ci s'est étirée et partiellement enfouie sous les tissus de l'hôte (Fig. 3c). Le quatrième jour (Fig. 3d) la greffe s'est considérablement allongée dans le sens de l'axe

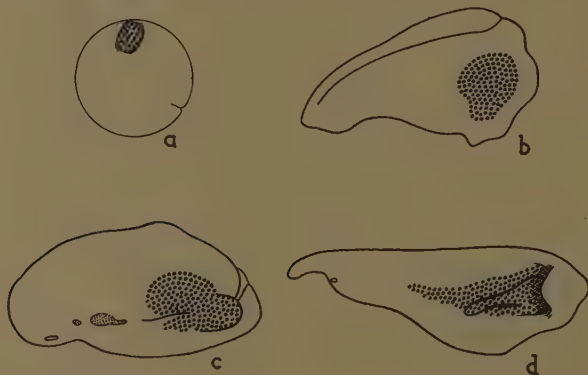


FIG. 3. Greffe d'ectoblaste centrifugé de *Rana temporaria* sur une gastrula normale de *Triturus helveticus*. (a) Immédiatement après l'opération. (b), (c), (d), stades successifs jusqu'au moment de la fixation.

céphalo-caudal de l'hôte, et la tête de l'hôte est nettement déviée vers la droite, au contact du greffon. L'embryon est fixé à ce stade. Sur coupes on constate que le greffon de *Rana* n'a constitué qu'une vaste glande adhésive, du mésenchyme, et une masse neuroïde pleine, encore pédiculisée à l'épiderme. Cependant le diencéphale de l'hôte, l'œil y compris, sont nettement hypertrophiés au contact du greffon. Commentaires: il s'agit de nouveau d'un 'effet de pont' et d'autant plus remarquable que l'hyperinduction du diencéphale de l'hôte est produite par le voisinage d'une greffe qui n'a produit que de la crête neurale, du tissu neuroïde et de la glande adhésive.

L'ensemble des résultats de ces expériences de greffe d'ectoblaste de jeunes gastrulas centrifugées de *Rana* au sein de l'ectoblaste ventral de gastrulas normales de Triton est résumé sur le tableau 1. *En conclusion*: l'ectoblaste activé de *Rana*, transporté au sein de l'ectoblaste normal de Triton peut produire des réactions de la part de cet hôte. Ces réactions sont de deux ordres: (a) une induction assimilatrice entraînant les tissus de Triton à participer à l'élaboration de l'embryon secondaire; (b) un 'effet de pont': l'extrémité antérieure de la gouttière médullaire envoie un diverticule au contact du greffon. Cet effet de pont n'est pas spécifique: des greffes ayant une évolution chordencéphalique et troncale, ou même simplement neuroïde peuvent induire une hypertrophie du diencéphale de l'hôte.

TABLEAU 1

Résultats de greffes d'ectoblaste présomptif de jeunes gastrulas centrifugées de Rana sur des gastrulas normales de Triton

No.	Emplacement de la greffe (Rana)	Évolution de la greffe	Réaction de l'hôte (Triton)	Remarques
2	Côté gauche de la tête	Glande adhésive, myélencéphale, otocyste	Augmentation de volume de la paroi gauche du cerveau	—
3	Région abdominale	Mésenchyme, otocystes	Nulle	—
4	Région branchiale gauche	Idem	Idem	—
5	Région abdominale antérieure	Myélencéphale, moelle, chorde, proctodaeum	(a) Formation d'otocystes, de rhombencéphale, de moelle, de somites (b) Induction d'une cavité digestive	Cf. texte et Fig. 1
6	Région ventrale de la tête	Glande adhésive	Nulle	—
8	Face latérale droite de la tête	Glande adhésive, crête neurale, masse neuroïde	Effet de pont: hypertrophie du diencéphale au contact du greffon	Cf. texte
9	Région abdominale	Chorde, somites, moelle	Réaction de l'hôte mais de nature indéterminée	Fixation trop jeune
10	Idem	Idem	Idem	Idem
12	Idem	Idem	Idem	Idem
11	Partie ventrale de la tête	Névraxe, somites, chorde	Effet de pont: expansion du diencéphale jusqu'au contact de la greffe	Cf. texte

RÉSULTATS. 2. INFLUENCE DE L'EMBRYON SECONDAIRE SUR LE MÉSOBLASTE VENTRAL ET L'ENDOBLASTE CHEZ *RANA TEMPORARIA*

Bien que la greffe xénoplastique constitue une condition de choix pour élucider les répercussions qu'exercent les organes secondaires sur la morphogenèse de l'hôte, il n'en est pas moins vrai que l'examen direct, sans autre expérimentation, des embryons résultant des séries centrifugées, permet souvent de dégager ces mêmes influences.

En effet, les éventuels organes mésoblastiques que la centrifugation produit par activation de l'ectoblaste diffèrent du mésoblaste vrai, c'est-à-dire du mésoblaste primaire, par une teneur moindre en plaquettes vitellines. Par exemple, en présence de tubes pronéphritiques au niveau de la paroi ventrale, il est possible, par la teneur des cellules en plaquettes, de décider s'il s'agit de dérivés de l'ectoblaste centrifugé, ou bien du mésoblaste ventral dont le potentiel morphogénétique a été élevé au contact des organes dorsaux issus de la centrifugation.

A titre d'illustration, nous présentons sur la Planche le détail du pronéphros d'un embryon dont la vue d'ensemble a été figurée dans notre second mémoire

(Pasteels, 1953*b*; Planche 2, fig. D). On peut y voir que le même pronéphros se compose de *deux sortes de cellules*: les unes, peu chargées de plaquettes sont d'origine ectoblastique, tandis que d'autres cellules possèdent la même charge en vitellus que le mésoblaste ventral dont elles dérivent.

TABLEAU 2

Comparaison des prestations de l'ectoblaste centrifugé et des réactions de l'hôte dans deux lots de la même ponte de Rana temporaria, centrifugés à des stades différents

A. CENTRIFUGATION AU STADE BLASTULA AVANCÉE

	Prestations de l'ectoblaste centrifugé							Réactions de l'hôte	
	Rhomben- céphale	Moelle	Cr. neur.	Ch.	Som.	Néphr.	Proct.	Endo- blaste	Néphr.
1	+	+	+	—	+	—	—	—	+
2	+	+	+	+	+	+	—	+	+
3	+	+	+	—	+	—	—	—	+
4	+	+	+	+	+	+	—	+	+
5	+	+	+	+	+	—	—	—	+
6	+	+	+	—	+	+	—	+	+
7	+	±	+	—	—	—	—	—	++
8	+	+	+	+	+	—	—	—	+
9	+	+	+	±	+	+	—	—	+
10	+	+	+	+	+	—	—	—	+
11	+	+	+	+	+	—	—	—	+
12	—	—	—	—	—	—	—	—	+
13	+	+	+	±	+	—	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B. CENTRIFUGATION AU STADE BLASTOPORE EN FAUCILLE

	Prestations de l'ectoblaste centrifugé							Réactions de l'hôte	
	Mésén- céphale	Moelle	Cr. neur.	Ch.	Som.	Néphr.	Proct.	Endo- blaste	Néphr.
1	—	—	+	—	—	—	+	—	—
2	—	—	+	—	—	—	+	—	—
3	—	±	+	—	—	—	+	—	—
4	—	±	+	—	—	—	+	—	—
5	—	—	+	—	+	—	+	—	+
6	—	—	+	—	—	—	+	—	—
7	—	—	+	—	—	—	+	—	—
8	—	—	+	—	—	—	—	—	—
9	—	—	+	—	—	—	+	—	+
10	—	—	+	—	—	—	—	—	—
11	—	—	+	—	—	—	+	—	—
12	—	—	+	—	—	—	+	—	+
13	—	—	+	—	—	—	—	—	—
14	—	—	+	—	—	—	—	—	—
15	—	—	+	—	—	—	+	—	+
16	—	—	+	—	±	—	—	—	—

ABRÉVIATIONS: *Cr. neur.*, dérivés de la crête neurale (mésenchyme, pigmentocytes, neuroblastes isolés); *Ch.*, chorde; *Som.*, somites; *Néphr.*, tubes néphritiques; *proct.*, proctodaeum; *endobl.*, endoblaste.

Une telle analyse permet de déceler deux ordres de réactions de l'«hôte» vis-à-vis du complexe d'organes issu de l'ectoblaste centrifugé: (a) une élévation du potentiel morphogénétique du mésoblaste ventral qui constitue ainsi du pronéphros et des tubes urétéraux; (b) un effet sur l'endoblaste: au contact de l'embryon primaire, la masse vitelline peut se pédiculiser, puis une partie des cellules endoblastiques peuvent se détacher de la masse principale, pour s'incorporer à l'embryon primaire. Corrélativement, il se creuse une lumière secondaire.

Ces effets sont contrôlés par deux facteurs: (a) le potentiel morphogénétique des complexes secondaires; (b) leur localisation dans l'embryon primaire.

(a) Nous savons que le *potentiel morphogénétique du complexe organique* issu de la centrifugation dépend du stade auquel l'œuf a été centrifugé (cf. Pasteels, II^e partie, 1953b, p. 126). Nous donnons ici (Tableau 2) un résumé récapitulatif des résultats obtenus dans deux lots de la même ponte de *Rana temporaria*, l'un centrifugé au stade de la blastula avancée, l'autre au stade du blastopore en petite faucille; n'ayant retenu pour cette comparaison que les embryons dont les ébauches secondaires sont placées au contact de la région abdominale.

Les prestations des deux séries sont très différentes. Les 14 embryons du 1^{er} lot montrent un rhombencéphale secondaire, et sauf dans un cas douteux, une moelle, accompagnée de crête neurale. La chorde est présente dans 7 cas, et en petite quantité, dans deux autres; il y a des somites dans tous les cas sauf un. Dans *tous les cas*, le mésoblaste ventral de l'hôte constitue des tubes néphritiques, sous forme de pronéphros, au contact de l'ébauche secondaire; tandis que l'endoblaste se pédiculise dans cinq cas.

Dans le second lot, centrifugé au stade du blastopore en croissant, les prestations de l'ectoblaste sont médiocres (cf. Pasteels, 1953b, p. 132): jamais de myélencéphale ni de chorde, de la moëlle dans deux cas douteux seulement, et une seule fois (plus un cas douteux) des somites. Les seules réactions apparaissant régulièrement sont les dérivés de la crête neurale (mésenchyme de nageoire et neuroblastes épars) ainsi qu'un proctodaeum. Aussi les réactions de l'hôte sont-elles minimales: aucun effet sur l'endoblaste, tandis que le mésoblaste ventral ne forme des tubes néphritiques que dans 4 cas sur 16.

La *qualité* de ces tubes néphritiques est différente d'ailleurs dans les deux séries: dans le lot centrifugé au stade de la blastula avancée, la forte élévation du potentiel morphogénétique suscite la formation de *pronéphros* à partir du mésoblaste ventral; tandis que dans le lot centrifugé au stade du blastopore en faucille, on ne voit apparaître que des tubes simples, non circonvolués, sans néphrostomes, ayant plutôt l'apparence d'un uretère primaire.

Notons enfin que *cette élévation de potentiel morphogénétique du mésoblaste ventral peut être suscitée par un 'inducteur' non spécifique*.

Lorsque le mésoblaste ventral entre en contact avec la chorde et les somites et constitue du pronéphros, il s'agit d'un effet Yamada. Mais la même élévation du potentiel morphogénétique peut s'observer, en l'absence de dérivés chordomésoblastiques, au contact d'un rhombencéphale (cas 7 du Tableau 2 A), ou même au

contact de simples dérivés de la crête neurale, ou d'un proctodaeum (cas 8, 12, et 15 du Tableau 2B). Donc l'élévation du potentiel morphogénétique du mésoblaste ventral au niveau néphritique peut résulter non seulement du contact avec du mésoblaste dorsal, mais aussi *du contact avec des dérivés neuraux ou ganglionnaires*.

(b) La *position* des complexes organiques secondaires par rapport à l'embryon primaire joue également un grand rôle quant à la nature des réactions de l'hôte. Des complexes organiques secondaires de nature tout à fait similaires (chordencéphaliques et spino-caudaux) peuvent se mettre en contact avec l'endoblaste à des niveaux divers: lorsque le contact s'opère au niveau du pharynx, c'est une paroi dorsale de *pharynx* qui est induite; tandis que c'est un intestin secondaire qui apparaît au niveau de la masse abdominale.

De même pour les tubes néphritiques: des pronéphros secondaires n'apparaissent que dans la zone s'étendant depuis l'extrémité postérieure du pharynx jusqu'aux limites postérieures du pronéphros normal. Une élévation de potentiel morphogénétique en arrière de cette zone, se traduit toujours par l'apparition de petits tubes uniques, et non circonvolués, qui ont plutôt le caractère d'un uretère.

Il en résulte que la formation d'un pronéphros à partir du mésoblaste ventral de l'hôte, au contact d'un complexe organique secondaire, dépend de deux conditions: (1) il faut que le complexe organique soit placé dans une zone de l'abdomen qui, bien que ventrale, corresponde à l'emplacement du pronéphros normal par rapport à l'axe céphalo-caudal; (2) il faut que l'ectoblaste activé ait été porté à un potentiel morphogénétique suffisant pour constituer de la chorde et des somites. Si une de ces conditions n'est pas remplie, l'élévation du potentiel morphogénétique du mésoblaste ventral ne se traduit que par la formation d'un tube urétéral.

RÉSULTATS. 3. INFLUENCE DES ÉBAUCHES SECONDAIRES SUR L'«HÔTE» CHEZ PLEURODELES WATLII

Nous avons vu (Pasteels, 1953*b*, p. 138) que l'œuf du Pleurodèle est moins sensible que celui de la Grenouille. C'est en centrifugeant les œufs au début de la gastrulation que l'on obtient l'effet le plus accusé: mais les complexes organisés résultant de l'activation de l'ectoblaste ne constituent que des queues secondaires, contenant des dérivés de la crête neurale, souvent une masse musculaire, mais jamais de chorde ni de névraxe. Lorsque ces «queues» sont localisées au niveau de la masse abdominale de l'hôte, elles s'accompagnent d'un proctodaeum.

Dans ces cas également il est possible de retrouver une influence de ces complexes caudaux, issus de l'activation de l'ectoblaste, sur l'endoblaste et le mésoblaste latéro-ventral de l'«hôte».

L'effet sur l'endoblaste est le même que chez la Grenouille: pédiculisation

d'une partie de la masse vitelline, formation d'une activité secondaire qui s'abouche dans le proctodaeum. Nous ne nous y arrêterons pas davantage.

En revanche, l'influence sur le mésoblaste latéral mérite d'être considéré plus attentivement, et nous en verrons sur les Fig. 4 et 5 deux exemples. La Fig. 4

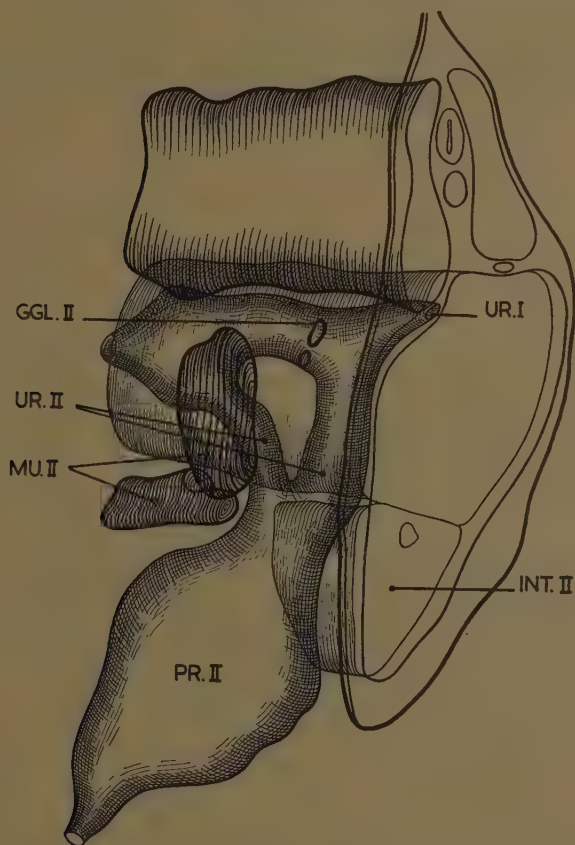


FIG. 4. Reconstruction graphique de la partie postérieure du tronc d'un embryon de *Pleurodeles* centrifugé au début de la gastrulation. La pièce est vue à 45° par l'avant et la droite. GGL. II, ganglions secondaires; INT. II, intestin secondaire; MU. II, muscles secondaires; PR. II, proctodaeum secondaire; UR. I, uretère primaire; UR. II, uretère secondaire.

nous présente la reconstruction d'un segment de tronc postérieur vu à 45° par l'avant et la droite. Le complexe secondaire est constitué par deux masses musculaires, quelques ganglions (plus du mésenchyme de nageoire qui n'est pas représenté sur la reconstruction) et un vaste proctodaeum. Au contact de celui-ci, une partie de la masse vitelline s'est pédiculisée et creusée d'une lumière secondaire. Partant de l'uretère primaire de l'hôte, nous voyons deux diverticules

urétéraux qui se rapprochent en Y et viennent s'aboucher dans le proctodaeum secondaire. L'examen histologique précise que ces diverticules urétéraux possèdent la densité des plaquettes vitellines caractéristiques du mésoblaste et ne sont donc pas formés à partir de l'ectoblaste activé.

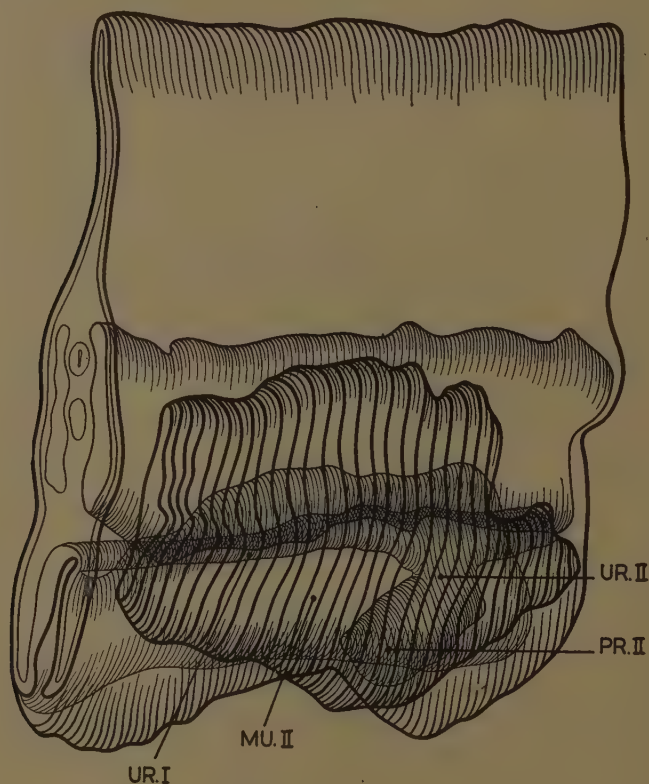


FIG. 5. Reconstruction graphique de la partie postérieure du tronc (à partir de l'anus) d'un embryon de *Pleurodeles* centrifugé au début de la gastrulation. La pièce est vue à 45° par l'arrière et la droite. MU. II, muscles secondaires; PR. II, proctodaeum secondaire; UR. I, uretère primaire; UR. II, uretère secondaire.

Il en est de même dans le cas reconstruit sur la Fig. 5. Ici le complexe secondaire, placé sur la partie postérieure du flanc gauche, se composait d'une grosse masse de cellules musculaires, de mésenchyme de nageoire, et d'un proctodaeum. Si l'endoblaste n'a pas réagi dans ce cas, il n'en est pas de même du mésoblaste latéro-ventral. Ici aussi, il s'établit un diverticule de l'uretère, allant rejoindre le proctodaeum secondaire.

Cette connexion entre l'uretère primaire et le proctodaeum secondaire est susceptible de deux interprétations: ou bien il s'agit d'une véritable métaplasie du mésoblaste latéro-ventral (destiné à constituer des lames latérales) situé entre l'uretère et le proctodaeum; ou bien le proctodaeum exercerait une véritable attraction sur l'uretère. Il est vraisemblable que les deux mécanismes interviennent simultanément: car l'augmentation du matériel urétéral est manifeste; d'autre part, Mlle Bijtel (1948), a démontré par des déplacements du proctodaeum sur de jeunes larves avant la migration de l'uretère vers le cloaque, l'existence effective de cette attraction.

CONCLUSIONS (RÉSUMÉ) DE LA III^E PARTIE

1. L'ectoblaste présomptif de jeunes gastrulas centrifugées de *Rana temporaria* a été greffé au sein de l'ectoblaste ventral de gastrulas normales de *Triturus helveticus*. Au contact de la greffe, les tissus de l'hôte peuvent présenter deux ordres de réactions: (a) une induction assimilatrice entraînant l'ectoblaste et le mésoblaste de Triton à participer à l'édification de l'embryon secondaire, lequel est élaboré pour sa plus grande part par la greffe; (b) une connexion s'établissant dans l'ectoblaste de l'hôte entre la plaque médullaire primaire et les tissus du greffon ('effet de pont'). Ce dernier effet n'est pas spécifique: des greffes ayant une évolution chordencéphalique et troncale, ou même simplement neuroïde, peuvent provoquer une hypertrophie du *diencéphale* de l'hôte.

2. Dans des embryons centrifugés de *Rana temporaria*, l'embryon secondaire, issu de l'ectoblaste activé, peut produire des modifications de l'endoblaste et du mésoblaste ventral primaire: l'endoblaste se pédiculise au contact des organes axiaux secondaires et une lumière digestive secondaire peut se creuser au sein de la masse endoblastique attirée vers l'embryon secondaire; le potentiel morphogénétique du mésoblaste ventral peut être élevé au niveau néphritique. Ces tubes néphritiques peuvent être soit du pronéphros, soit des uretères primaires.

3. La constitution du pronéphros à partir du mésoblaste ventral, répond à deux conditions: (a) la localisation par rapport à l'axe céphalo-caudal, (b) le potentiel morphogénétique des ébauches secondaires. Si celles-ci ne sont constituées que par des masses neuroïdes, ou par des dérivés de crête neurale, elles ne peuvent, de toute façon, qu'induire la formation d'uretères; si elles sont constituées de névraxe, de chorde, de somites elles peuvent induire la formation de pronéphros, mais uniquement dans le mésoblaste ventral compris depuis le pharynx postérieur jusqu'à la limite postérieure du pronéphros normal.

4. Le mésoblaste ventral peut être élevé au niveau néphritique, non seulement au contact de chordomésoblaste, mais aussi au contact de formations purement neurales. Il s'agit de nouveau d'une réaction non spécifique.

5. La centrifugation de jeunes gastrulas de Pleurodèles provoque la formation d'ébauches secondaires se composant d'amas myoblastiques, de ganglions, de queues accessoires. Lorsque ces ébauches se trouvent au contact de la masse

vitelline primaire, elles s'accompagnent d'un proctodaeum: il s'établit une ou plusieurs dérivations faisant communiquer l'uretère primaire avec cet amas secondaire.

IV. Discussion générale et conclusions

1. INDUCTION ET ACTIVATION AUTONOME: LES MODALITÉS DE RÉACTION DE L'ECTOBLASTE

Les modalités de réaction de l'ectoblaste peuvent être considérées sous trois angles différents: (a) Ses réponses à l'inducteur normal, dans le cours normal du développement. (b) Ses prestations sous l'influence d'un inducteur hétérogène. (c) Ses modalités de réaction, en l'absence d'inducteur, vis-à-vis d'agents chimiques ou physiques (activation autonome).

(a) La séquence dorso-ventrale: névraxe, crête neurale, épiderme s'établit sous l'influence de facteurs quantitatifs, d'un gradient dorso-ventral du potentiel morphogénétique du chordomésoblaste inducteur (Dalcq & Pasteels, 1938; Raven & Kloos, 1945).

Par rapport à l'axe céphalo-caudal, on distingue actuellement deux modalités tranchées: l'induction acrencéphalique ('archencéphalique' suivant Lehmann, 1938) et l'induction chordencéphalique et spino-caudale (cf. Lehmann, 1938; Dalcq, 1950). C'est précisément un des problèmes les plus difficiles de l'embryologie actuelle, que de déterminer en quelle mesure ces deux types d'induction relèvent de différences qualitatives ou quantitatives (cf. Dalcq, 1950; Toivonen, 1950; T. Yamada, 1950; Nieuwkoop *et al.*, 1952).

Retenons également, qu'il existe dans le développement normal, mais dans une mesure limitée, une induction mésoblastogène: les somites caudaux, issus de la partie postérieure de la plaque médullaire chez les Urodèles sont réellement induits par la partie la plus caudale du chordomésoblaste (Spofford, 1948).

(b) L'induction hétérogène, c'est-à-dire à partir de fragments de tissus adultes, découverte par Holtfreter (1934), a fait l'objet d'études nombreuses et systématiques (Chuang, 1940; Toivonen, 1940, 1950, 1953; Yamada, 1950; Kuusi, 1953). On peut affirmer que dans cette modalité d'induction, les prestations de l'ectoblaste dépassent celles du développement normal. Sous l'effet d'inducteurs hétérogènes divers, ou plus ou moins dénaturés, on retrouve la distinction entre les inductions acrencéphalique et chordencéphalo-spinale. Mais dans ce cas l'induction spinale s'accompagne toujours d'une induction mésoblastogène très considérable, constituant à partir de l'ectoblaste, de la *chorde*, des somites non seulement caudaux, mais *troncaux*. De telles manifestations sont étrangères au cours du développement normal, où comme nous l'avons vu, l'inducteur ne provoque la formation que de somites caudaux, et *jamais* de la chorde.

Ainsi, l'induction hétérogène décèle des possibilités de réaction qui ne sont pas exprimées dans le cours normal du développement.

De plus il apparaît que la dénaturation d'un inducteur spinal par la chaleur (Chuang, 1940), par des agents dénaturants des protéines (Kuusi, 1953), fait disparaître l'induction spinale (y compris les réactions mésoblastogènes) et fait corrélativement apparaître une induction acrencéphalique. Ces résultats sont susceptibles de deux interprétations. (1) Les deux inducteurs, qualitativement différents, étaient présents avant la dénaturation, mais l'inducteur acrencéphalique était masqué par l'action spinale prépondérante; celle-ci résulte d'un facteur plus labile, détruit par la dénaturation, ce qui permet l'expression du facteur acrencéphalique, plus résistant. Cette thèse est défendue par Toivonen. (2) Sous l'effet de la dénaturation, l'inducteur spinal est *transformé* en inducteur acrencéphalique. Il est à remarquer que malgré le travail considérable qui a été réalisé dans cette direction, nous ne disposons pas d'arguments cruciaux permettant de départager ces deux hypothèses.

(c) Il y a quinze ans, il était universellement admis que l'induction était absolument indispensable pour permettre toute prestation morphogénétique de la part de l'ectoblaste. Aussi fut-ce une grande surprise, de voir que l'ectoblaste peut être activé, par des agents chimiques ou physiques, en l'absence d'inducteur. Ce furent d'abord en 1939 Beatty, de Jong & Zielinski qui montrèrent que la culture dans des solutions très diluées de colorants basiques permet dans un ectoblaste dilué, l'évolution neurale.¹ Puis ce fut Barth (1941) qui découvrit que l'ectoblaste cultivé en solution saline était, dans certains cas, capable de produire des structures neurales indépendamment de tout inducteur. Ce phénomène fut alors analysé par Holtfreter (1945, 1947) qui mit en évidence l'influence de la 'subcytolysé': des conditions de culture défavorables, trop acides, trop alcalines, en l'absence de Calcium, provoquent également une évolution neurale dans un ectoblaste isolé. Cependant Holtfreter insista sur une conclusion importante: cette neuralisation autonome ne mène qu'à des structures acrencéphaliques, et jamais chordencéphaliques ni spinales. Dans le même ordre d'idées, citons le travail de Yamada (1950) qui soumet à l'action de l'ammoniaque, l'ectoblaste et la zone marginale ventrale de jeunes gastrulas de *Triturus pyrrhogaster*; l'ectoblaste traité par l'ammoniaque a formé des organes exclusivement acrencéphaliques, tandis que la zone marginale ventrale, traitée de la même façon constituait des organes dorsaux: chorde, somites et névraxe. Nous ne pouvons songer à discuter ici la théorie du double potentiel développé sur ces bases expérimentales,² mais nous retiendrons le fait qu'un agent susceptible d'élever le potentiel morphogénétique (au sens de Dalcq & Pasteels) du chordomésoblaste ventral, est en même temps un activateur cérébrogène.

Le fait nouveau qu'apportent nos expériences de centrifugation, c'est une modalité chordencéphalo-troncale de l'activation autonome. L'effet de la centri-

¹ Holtfreter (1945, 1947) a attribué la neuralisation sous l'effet des colorants basiques à une action cytotytique de ces conditions de culture. Il n'en est rien. Nous avons nous-même répété les expériences de Beatty, De Jong, & Zielinski sur *Rana temporaria*, et avons pu confirmer entièrement leurs conclusions, en l'absence de toute tendance à la cytolysé (résultats restés inédits).

² Cf. Dalcq & Pasteels, revue d'ensemble en préparation.

fugation sur l'ectoblaste de la jeune gastrula de *Rana* se superpose exactement à celui d'une induction hétérogène à action 'spinale', comme celle du rein de Cobaye (Toivonen, 1940); l'identité est complète car, de même que dans l'induction hétérogène, l'ectoblaste ne constitue pas seulement des organes neuraux, mais aussi une abondance de complexes chordo-mésoblastiques.

Conclusions

1. Les facteurs responsables de toutes les réalisations acrencéphaliques, chorcencéphaliques, spinales, neurogènes et mésoblastogènes *sont présents au sein de l'ectoblaste. Ces facteurs sont toutefois inefficaces dans le cours normal du développement.* L'action de la précytolyse produit une augmentation de la basophilie (J. Brachet, 1950), vraisemblablement corrélative à une augmentation de la synthèse des protéines. L'action de la centrifugation — d'ailleurs modérée — entraîne vraisemblablement de nouveaux contacts entre des particules cytoplasmiques; comme a commencé à le montrer une recherche faite en collaboration avec J. Brachet, les régions sensibilisées de l'ectoblaste deviennent intensément basophiles et apparaissent même plus riches en granules ribonucléiques que n'importe quelle partie du germe normal, au même stade.

2. Les deux réactions principales: acrencéphalique et spinale (celle-ci avec son complément mésoblastique) sont deux caractéristiques de l'activation autonome. L'ectoblaste activé *peut répondre de deux façons, en l'absence de tout inducteur.* Sous l'action de la subcytolyse, il répond: acrencéphale; sous l'action de la centrifugation: chorcencéphale, moelle, chorde et somites. Comme nous le verrons d'ailleurs, les modalités de cette dernière réponse sont modulées d'après le stade atteint par l'ectoblaste au moment où il est centrifugé.

Le problème de la spécificité de la réaction inductrice, acrencéphalique ou troncale, neurale ou mésoblastogène est posé actuellement dans toute son acuité. On peut procéder, comme le font Toivonen (1950, 1953) et Kuusi (1953) à des extractions à partir de tissus adultes dont on connaît l'action inductrice hétérogène, en espérant pouvoir isoler ainsi des substances inductrices spécifiques. Nous ne nierons pas l'intérêt de ces tentatives. Mais nous serions tenté d'y faire une objection d'ordre méthodologique: trop d'attention a été portée jusqu'ici sur l'*inducteur*, et trop peu sur le *réacteur*. Lorsque nous voyons le réacteur répondre de façon différente à diverses 'excitations' chimiques ou physiques, il devient évident que le secret de la spécificité acrencéphalique ou troncale se trouve au moins en partie dans le réacteur. Dans ces conditions, il devient extrêmement difficile d'affirmer que tel extrait de tissu adulte, ayant une action inductrice déterminée est identique ou même similaire à l'inducteur normal. Il est en effet possible que divers agents, totalement différents, éveillent un même mécanisme dans le réacteur et y provoquent ainsi des réactions identiques. La comparaison faite par Holtfreter (1948) avec le mécanisme de la parthénogénèse mérite d'être retenue.

2. ÂGE DE L'ECTOBLASTE ET RÉACTIVITÉ A LA CENTRIFUGATION

Dans un travail récent, Gallera (1952) a réétudié les réactions de l'ectoblaste vieillissant vis-à-vis d'un inducteur céphalique, et complété ainsi les résultats déjà anciens de Holtfreter (1933) montrant qu'au fur et à mesure qu'un ectoblaste perd sa compétence, ses réponses envers un même inducteur deviennent différentes. Nous sommes ainsi bien informés sur l'évolution de la compétence aux stades tardifs où celle-ci tend à disparaître, mais jusqu'ici nous ignorions tout de variations éventuelles dans la réactivité de l'ectoblaste des stades plus jeunes.

Cette variabilité nous est apparue, et très grande, surtout chez les espèces qui, comme *Rana temporaria* et *Xenopus laevis*, se sont montrées les plus sensibles aux effets de la centrifugation.

Notons d'abord que la période de sensibilité à la centrifugation est entièrement différente de celle de la compétence aux effets de l'inducteur normal: elle est beaucoup plus précoce: les effets de la centrifugation apparaissent dès le stade blastula et disparaissent entièrement au stade de blastopore en faucille. Une remarque à ce propos: qu'en est-il de l'autre mode d'activation autonome, celui qui est réalisé par la subcytolyse? Pour autant que nous soyons bien informés, il nous semble que toutes les expériences dans lesquelles un fragment d'ectoblaste a été isolé et placé dans des conditions subléthales, ont été effectuées sur des gastrulas jeunes à une période qui correspond précisément au maximum de réactivité à la centrifugation. Il ne serait pas sans intérêt de reprendre ces expériences d'activation par subcytolyse, sur des ectoblastes plus âgés.

Au fur et à mesure que l'ectoblaste vieillit, depuis la jeune blastula jusqu'à la jeune gastrula, sa réactivité vis-à-vis de la centrifugation évolue, non seulement de façon quantitative, mais aussi *qualitative*. Reprenons l'exemple de la Grenouille. Dans la blastula jeune, les réactions ne sont que subliminales: c'est-à-dire qu'elles ne peuvent s'exprimer dans un ectoblaste isolé mais dépassent les prestations normales sous l'effet de l'organisateur primaire; elles forment alors un surcroît de vésicules neurales, et aussi des nodules de chorde au sein du névraxe. (Nous reviendrons sur ce point au n° 4 de cette discussion.) Dans la blastula moyenne, ces manifestations d'hyperinduction apparaissent encore mais s'accompagnent d'ébauches secondaires. Dès ce moment, l'activation de l'ectoblaste a dépassé le seuil et ses effets peuvent se manifester indépendamment du champ d'induction primaire; cependant à ces stades encore précoces, ces embryons secondaires se composent essentiellement de névraxe et de chorde, rarement de somites (cf. les graphiques de la Fig. 2, p. 134, Pasteels, 1953b). Le tableau change encore, lorsque la centrifugation s'opère au stade de la toute jeune gastrula. *Quantitativement*, le nombre de réactions s'accroît; mais on y trouve également un changement *qualitatif*: la réaction neurale est au moins tout aussi vive, même plus élevée, cependant la réaction chordale a sensiblement décru, tandis que la réaction somitique est nettement augmentée. Vient enfin la phase terminale, celle du blastopore en faucille: les proportions de névraxe ont

décru sensiblement, la réaction chordale a complètement disparu, la réaction somitique est devenue rare; en revanche des otocystes isolés, ainsi que les dérivés de la crête neurale sont plus fréquents.

Conclusion. Depuis le stade jeune blastula jusqu'à la gastrulation la réaction de l'ectoblaste est en constante évolution; la *qualité* de la réponse morphogénétique vis-à-vis d'un même agent activant (en l'occurrence la centrifugation) dépend du stade atteint par l'ectoblaste au moment où il a été activé.

3. L'ACTION DE LA CENTRIFUGATION SUR LE CHORDOMÉSOLASTE

Après centrifugation de la blastula jeune de *Rana temporaria* et de *Xenopus laevis*, il est apparu dans un nombre de cas variant de 17 à 26 pour cent, une chordalisation de la plaque préchordale. De tels embryons, nous l'avons vu (Pasteels, 1953b, p. 142) montrent dès les premières coupes de la tête, une chorde très dilatée. Il s'agit d'une véritable *troncalisation* partielle de la tête, avec réduction du pouvoir inducteur cérébrogène. Dans ses formes extrêmes, cette chordalisation entraîne la disparition des organes olfactifs et oculaires et de toute structure prosencéphalique, le 'cerveau' étant constitué par un gros massif plein, tandis que le rhombencéphale, très réduit, ne montre pas de cavité ventriculaire. Cette microcéphalie, d'un type inédit, est différente de la microcéphalie par hypomorphose (résultant par exemple de l'action du LiCl ou de températures supramaximales). Dans l'hypomorphose la microcéphalie, correspondant à un abaissement du potentiel morphogénétique, ne s'accompagne jamais d'une dilatation de la chorde, mais souvent, au contraire, d'une réduction de la chorde.

Le mécanisme de cette anomalie inédite peut se comprendre à la lueur des travaux de K. Okada et ses collaborateurs (Okada & Takaya, 1942; Okada & Hama, 1943, 1944) qui ont montré que la partie de l'organisateur située immédiatement au-dessus de laèvre blastopore dorsale (donc le futur organisateur céphalique), *prélevé au début de la gastrulation et mis dans la possibilité d'induire dès ce stade*, agit comme un organisateur troncal; lorsque ce même fragment d'organisateur est prélevé après son invagination, ou lorsqu'il est maintenu en culture pendant une vingtaine d'heures, il acquiert ses propriétés bien connues d'organisateur céphalique. Ainsi, il s'opère dans le chordomésolaste inducteur une maturation progressive qui transforme la zone située au-dessus de laèvre blastopore dorsale et qui la mène du niveau troncal au niveau céphalique.

Il semble donc que sous l'effet d'une centrifugation préalable (aux stades de la blastula moyenne ou jeune) cette maturation ait été inhibée.

4. INDUCTION NEUROGÈNE ET MÉSOBLASTOGÈNE

Nous avons vu comment les greffes hétérogènes de tissus adultes provoquent une induction mésoblastogène beaucoup plus abondante qu'au cours du développement normal (où cette induction ne porte que sur les somites caudaux). Tout récemment Toivonen (1953), reprenant une thèse déjà défendue par Chuang

(1940) conclut que les inductions neurogènes et mésoblastogènes sont vraisemblablement dues à des substances spécifiques différentes. L'argumentation de Toivonen est basée sur les résultats des greffes hétérogènes où l'inducteur était constitué par de la moelle osseuse, soit fixé par l'alcool, soit traité par la chaleur. Nous avons vu plus haut, que l'argumentation basée sur l'action des inducteurs hétérogènes n'est pas nécessairement décisive puisque des agents non spécifiques peuvent déclencher des réactions spécifiques au sein de l'ectoblaste.

Nous voudrions insister ici une fois de plus (cf. Pasteels, 1951) sur la parenté entre les réactions neurale et chordomésoblastique. Rappelons rapidement les arguments déjà développés antérieurement: l'induction 'rétrograde' de Raven (1938) dans laquelle un fragment de plaque neurale greffé sur la face ventrale d'un embryon, exerce une action sur le feuillet moyen et fait surgir des organes axiaux au sein du mésoblaste ventral sous-jacent; la neuralisation d'un fragment de chordomésoblaste (Dalcq & Lallier, 1948; Töndury, 1948) lorsque, à la suite d'un incident opératoire, ce fragment se trouve bloqué dans la masse vitelline.

Les résultats de la centrifugation apportent des arguments puissants en faveur d'une parenté très proche des réactions neurogène et chordogène, entre lesquelles n'existent peut-être que des différences d'ordre quantitatif. Soulignons les très nombreux cas de réactions mixtes où cellules nerveuses et chordales étaient associées inextricablement dans les mêmes limites d'un seul et même organe. De plus rappelons les résultats de la sensibilisation subliminale. Chez la grenouille, la centrifugation de la jeune blastula sensibilise l'ectoblaste, qui cependant n'est pas capable de réagir en dehors du champ d'induction normal. Mais sous l'influence de l'inducteur normal (neurogène) cet ectoblaste sensibilisé donne non seulement des vésicules neurales supplémentaires, mais aussi des amas de corde, inclus dans le névraque. Cette hypothèse, que la réaction chordale résulterait d'une induction plus 'forte' que la réaction neurale, mériterait d'être vérifiée par voie expérimentale.

5. SUBSTANCES MORPHOGÉNÉTIQUES SPÉCIFIQUES OU POTENTIEL MORPHOGÉNÉTIQUE

La valeur explicative de 'substances spécifiques' dans les inductions ou les corrélations morphogénétiques reste médiocre — à moins qu'on n'adopte la solution commode, mais peu satisfaisante, des 'potentialités'. A côté de l'induction assimilatrice, que de cas où la réponse morphogénétique montre un défaut de spécificité. Rappelons-en des exemples nouveaux que nous avons eu l'occasion de rencontrer au cours de cette analyse: la formation de pronéphros aux dépens du mésoblaste ventral, au contact d'un rhombencéphale, ou de simples dérivés de la crête neurale; l'augmentation du *diencéphale* d'un hôte au contact d'une greffe *chordencéphalique*. Dans le cadre d'une conception morphogénétique à base quantitative, comme celle du potentiel morphogénétique (Dalcq & Pasteels, 1937, 1938, 1954), de telles corrélations trouvent une interprétation aisée.

CONCLUSIONS (RÉSUMÉ) DE LA IV^E PARTIE

1. Une comparaison est faite entre l'induction normale, l'induction par greffes hétérogènes, la neuralisation autonome par subcytolyse, et l'activation par centrifugation. Nous concluons: que les facteurs responsables de réalisations acrencéphaliques, chordencéphaliques, spinales, neurogènes et mésoblastogènes sont présents au sein de l'ectoblaste, mais inefficaces dans le développement normal; que les deux réalisations principales: acrencéphalique et spinale (celle-ci étant accompagnée de la réaction mésoblastogène) dépendent au moins autant de l'ectoblaste réacteur que de l'inducteur éventuel. La recherche éventuelle d'inducteurs spécifiques *normaux* par l'analyse des inducteurs provenant de tissus ou d'extraits de tissus adultes est soumise à certaines critiques d'ordre méthodologique. Nous insistons sur le rôle du réacteur dans les manifestations spécifiques de l'induction.

2. La période de sensibilité de l'ectoblaste à la centrifugation, s'étendant de la jeune blastula à la jeune gastrula, ne correspond pas à la période de compétence — beaucoup plus tardive — envers l'inducteur normal. De plus, durant cette période de sensibilité, la réaction de l'ectoblaste est en évolution progressive mais constante: la qualité de la réponse morphogénétique vis-à-vis d'un même agent activant varie suivant l'âge de l'ectoblaste.

3. Au stade blastula jeune et moyenne, chez la Grenouille et le Xénope, la centrifugation produit une chordalisation de la plaque préchordale. A la lueur des conclusions d'Okada et ses collaborateurs, il est admis que la centrifugation agit en inhibant la 'maturation' du futur organisateur céphalique.

4. Nous insistons sur la très grande parenté entre l'induction neurogène et mésoblastogène. Certains de nos résultats peuvent s'interpréter comme si l'induction chordogène représentait une modalité d'induction quantitativement plus élevée que l'induction neurogène.

5. Des inductions et des corrélations morphogénétiques non spécifiques, dont nous donnons de nouveaux exemples, se laissent mieux interpréter dans le cadre théorique quantitatif du potentiel morphogénétique que dans celui d'éventuelles substances spécifiques.

SUMMARY OF PARTS I-IV

(Part I, Pasteels, 1953a; Part II, Pasteels, 1953b)

PART I. *Mechanism of formation of secondary organs from the ectoblast*

1. Centrifugation of the amphibian blastula or gastrula at an acceleration of 460 g. for from 1 to 10 minutes causes the collapse of the blastocoele roof. In further development of such embryos one of two things may happen:

- (a) If centrifugation is carried out at an insensitive stage (such as that with a crescent-shaped blastopore in the frog) the roof of the blastocoele loses its folds and development is normal.

(b) If the eggs have been centrifuged at a sensitive stage (advanced blastulae or very young gastrulae in *Rana* or *Xenopus*) the cells of the collapsed blastocoele roof form a coherent mass which persists, and within which a morphogenetic process takes place.

2. At neurulation this mass of animal cells, to be found on the flank or the abdomen of the embryo, splits into two layers. The outer forms neural structures, the inner chorda-mesodermal ones. The formation of small secondary medullary plates can be seen externally. These generally follow the orientation of the primary medullary plate and fuse with it in their cephalic region.

3. The most differentiated secondary embryos (obtained by centrifuging very young gastrulae of *Rana temporaria*) are constituted as follows. The nervous system consists generally of a rhombencephalon and a spinal cord. In front it emerges from the primary brain with which it is fused. Notochord, somites, and sometimes nephric tubules are also found. These formations often end in a caudal structure. The tendency towards the formation of an embryonic axis is, however, incomplete and always disharmonious, there being no normal correlation between the extent of the neural structures and that of the underlying chorda-mesoderm or between the notochord and the somites which generally accompany it.

4. This morphogenetic effect is a result of a direct activation of the ectoblast cells. For this there are two experimental proofs:

(a) Presumptive ectoblast taken immediately after centrifugation and cultivated *in vitro* gives rise to neuro-chorda-mesoblastic complexes.

(b) Secondary axes are formed after grafting such ectoblast to the ventral part of a normal gastrula, either as homoplastic (*Xenopus* to *Xenopus*) or a heteroplastic (frog to newt) graft.

5. Tissue complexes obtained from explants remain amorphous and do not produce true organs or embryonic axes. Experiments with the grafts mentioned above show that:

(a) it is the primary field of organization of the embryo which gives them an axial arrangement with cephalo-caudal polarity;

(b) the confluence of the primary brain and the secondary 'brain' is due to a secondary elevation of the morphogenetic potential of the territories lying between the two systems.

6. Besides these major manifestations lesser effects may be obtained, e.g. after centrifuging the young blastula of the frog or the young gastrula of the axolotl. In these cases supplementary cerebral vesicles or neuro-sensory complexes, always associated with the primary brain, may be formed. In the frog these anomalies are accompanied by intracerebral chordal nodules.

This 'subliminal sensitization' is incapable of showing its effects after explanation. The additional action of the normal organizer is necessary for these manifestations and this is shown by a comparison between grafts of centrifuged

ectoblast of the axolotl placed ventrally with those placed in presumptive neural territory.

PART II. *Sensitivity at different stages and in different species*

1. A comparative study of sensitivity to centrifugation in samples taken at successive stages from eggs of *Rana temporaria* laid at the same time shows that the anomalies could only be obtained during a fairly short period of development. This period extends from the 17th to the 25th hour of development at 20° C., i.e. from the mid-blastula to the gastrula with a small crescent-shaped blastopore. The reaction is maximal at about the 21st hour (very young gastrula stage).

2. There are differences, sometimes considerable, in the sensitivity of different batches of *Rana temporaria* eggs. This is shown both in the percentage of anomalies obtained and, to a lesser extent, in the nature of the reaction.

3. It is, however, possible to draw certain general conclusions from a comparison of the results obtained with different batches of *Rana temporaria* eggs:

- (a) Two types of reaction may be distinguished: (i) The formation of supplementary neural vesicles and chordal masses embedded in the nervous system. These are due to the combined action of a 'subliminal sensitivization' and the influence of the normal inductor. (ii) The production of ectopic and incomplete embryonic axes by an 'autonomous activation' of the ectoblast. The time limits for obtaining this second reaction are far more precise than for the first.
- (b) The chordal nodules embedded in the brain or spinal cord as a result of subliminal sensitivization are only to be found after centrifugation of early stages (early and mid-blastulae), whilst the supplementary neural vesicles can be seen as often after centrifugation of late as of early stages.
- (c) The secondary axes resulting from autonomous activation always contain a neural anlage, often but not necessarily associated with chorda-mesoblast. The frequency of appearance of different mesoblastic organs varies both absolutely and relatively with the stage of treatment. In absolute numbers the notochord is more often found than somites, and these more often than pronephric tubules; while in relative numbers the maxima of frequency of appearance of notochord, somites, and pronephros respectively succeed each other as the age at treatment is increased.
4. The results obtained with *Xenopus laevis* closely resemble those obtained with the frog, but the period of sensitivity falls earlier.
5. In *Pleurodeles* the ectoblast seems to be less sensitive to centrifugation. The secondary axes are exclusively caudal in nature. The period of sensitivity occurs later.
6. The reactions of *Ambystoma punctatum* resemble those of *Pleurodeles* but the period of sensitivity (blastula) is precocious.
7. The axolotl is sensitive from the young blastula to the young gastrula stage,

and there is no quantitative difference in the reactions obtained between these stages. Anomalies occur only in a proportion of the eggs treated and consist solely of supplementary neural vesicles. Thus one of the manifestations of subliminal sensitization here occurs to the exclusion of the other (the formation of chordal inclusion).

8. The eggs of *Discoglossus* show only a very slight sensitivity, and those of three newts (*Triturus vulgaris*, *T. helveticus*, and *T. alpestris*) are not sensitive to centrifugation.

9. The eventual qualitative differences between the reactions do not depend upon the duration or acceleration of the centrifugation but only upon the stage of development at which the egg has been centrifuged.

10. In the frog and in *Xenopus* there occurs, in a certain number of cases and only after early centrifugation (of the blastula), a hitherto undescribed anomaly. This is characterized by the chordalization of the pre-chordal plate combined with defects in the quantity and quality of cerebral induction.

11. In the frog centrifugation of the blastula—and the effect is specific for this stage—brings about the formation of excess of notochord by three different processes: the chordalization of the pre-chordal plate, the appearance of chordal nodules embedded in the brain or spinal cord, and a chordal preponderance in the secondary axis.

PART III. *Interaction between primary and secondary structures*

1. Presumptive ectoblast from young centrifuged gastrulae of *Rana temporaria* was grafted into the ventral ectoblast of normal gastrulae of *Triturus helveticus*. The tissues of the host in contact with the graft may show two kinds of reaction:

- (a) An assimilative induction in which the ectoblast and mesoblast of the newt participate in the construction of the secondary embryo which is mainly formed from the graft.
- (b) The establishment of a connexion in the ectoblast of the host between the primary medullary plate and the tissues of the graft (bridge effect). The latter effect is not specific: grafts with a chondrocephalic and truncal, or even simply neuroid, development can produce a hypertrophy of the host diencephalon.

2. In centrifuged embryos of *Rana temporaria* the secondary embryo that arises from activated ectoblast may cause modifications of the endoblast and of the primary ventral mesoblast. A part of the endoblast detaches itself from the main yolk mass in contact with the secondary axial organs and in it a secondary digestive cavity may be hollowed out. The morphogenetic potential of the ventral mesoblast may be raised to the nephritic level, and there may then be formed either true pronephric tubule or only pronephric ducts.

3. The formation of the pronephros from ventral mesoblast depends upon two factors:

- (a) Position in respect of the cephalo-caudal axis.
- (b) The morphogenetic potential of the secondary anlagen. If these are formed only of neuroid masses or of derivatives of the neural crest, only ducts are formed. If, on the other hand, they consist of neural tube, notochord, and somites, they can cause the formation of pronephros, though only in the ventral mesoblast between the limits of the posterior pharynx and the posterior end of the normal pronephros.
- 4. The ventral mesoblast may be raised to the nephric level by contact not only with the chorda-mesoblast but also with purely neural formations. This is again a case of non-specific reaction.
- 5. Centrifugation of young gastrulae of *Pleurodeles* provokes the formation of secondary systems made up of accumulation of myoblasts, spinal ganglia, and accessory tails. When these systems lie in the belly region of the primary embryo they also have a proctodaeum. One or more connexions then arise between the pronephric duct and this secondary proctodaeum, and these connexions are formed from the ventro-lateral mesoblast.

PART IV. *General conclusions*

1. Normal induction is compared with (a) induction by heterogeneous grafts, (b) autonomous neuralization by subcytolysis, and (c) activation by centrifugation. We conclude that the factors responsible for acrencephalic, chordencephalic, or spinal differentiations and also for neural or mesoblastic inductions are present within the ectoblast but are ineffective in normal development. We further conclude that the two principal differentiations—acrencephalic and spinal (the latter being accompanied by the mesoblastogenic reaction)—depend at least as much upon the reacting ectoblast as upon the inductor. We make certain criticisms, of a methodological nature, of the quest for *normal* specific inductors by means of extracts of adult tissues. We stress the part played by the reactor in specific manifestations of induction.

2. The period of sensitivity of the ectoblast, which extends from the young blastula to the young gastrula, does not correspond with the period of competence to the normal inductor. Further, the reaction of the ectoblast changes progressively throughout this period of sensitivity. The nature of the morphogenetic reaction provoked by the same activating agent varies with the age of the ectoblast.

3. Centrifugation of young or mid-blastulae of frog or *Xenopus* produces a chordalization of the pre-chordal plate. In the light of the conclusions of Okada and his co-workers it is suggested that centrifugation acts by inhibiting the maturation of the future cephalic organizer.

4. We stress the close relationship between neurogenic and mesoblastogenic induction. Some of our results may be taken as indicating that chordogenic induction represents a form of induction quantitatively higher than neural induction.

5. The interpretation of non-specific inductions and morphogenetic correlations, of which new examples are given, enters more easily into the picture made by the quantitative theory of morphogenetic potential than into that of specific substances.

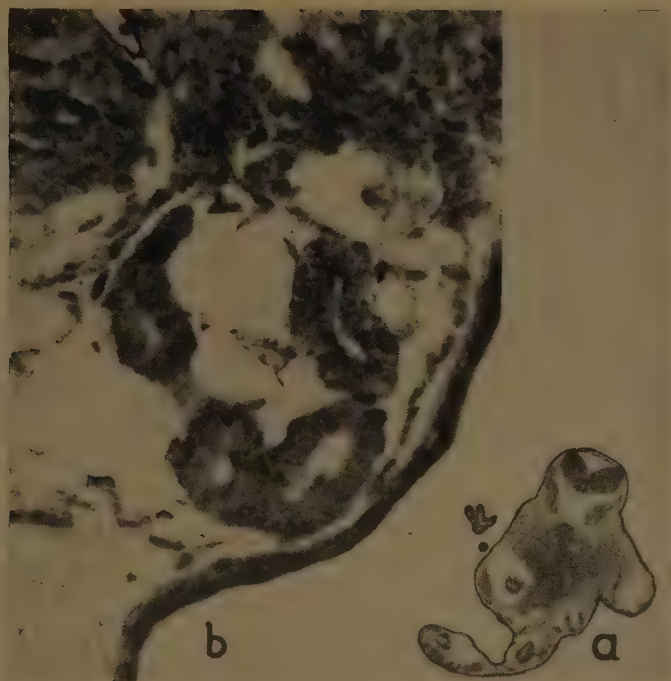
TRAVAUX CITÉS

- BEATTY, R. A., DE JONG, S., & ZIELINSKI, M. A. (1939). Experiments on the effects of dyes on induction and respiration in the amphibian gastrula. *J. exp. Biol.* **16**, 150-4.
- BUTTEL, J. H. (1948). Déviation expérimentale de l'uretère primaire par la greffe de matériel cloacal chez le Triton. *Experientia*, **4**, 389-90.
- BRACHET, J. (1950). Caractéristiques biochimiques de la compétence et de l'induction. *Rev. suisse Zool.* **57**, suppl. 1, 57-76.
- CHUANG, H. H. (1939). Induktionsleistungen von frischen und gekochten Organenteilen (Niere, Leber) nach ihrer Verpflanzung in Explantate und verschiedene Wirtsregionen von Tritonkeimen. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **139**, 556-639.
- (1940). Weitere Versuche über die Veränderung der Induktionsleistungen von gekochten Organenteilen. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **140**, 25-38.
- DALCQ, A. (1950). La genèse du complexe inducteur chez les Chordés. *Rev. suisse Zool.* **57**, suppl. 1, 5-22.
- & LALLIER (1948). Transplantations de territoires variés de la zone marginale médio-dorsale de la jeune gastrula chez le Triton. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **49**, 267-377.
- & PASTEELS, J. (1937). Une conception nouvelle des bases physiologiques de la morphogénèse. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **48**, 669-710.
- (1938). Potentiel morphogénétique, régulation et 'axial gradients' de Child. *Bull. Acad. Méd. Belg.*, VI^e série, **3**, 261-308.
- (1954). Sous presse.
- GALLERA, J. (1952). Inductions céphaliques dans l'ectoblaste vieillissant. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **146**, 21-68.
- HOLTGRETER, J. (1934). Über die Verbreitung induzierender Substanzen und ihre Leistungen im Triton-Keim. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **132**, 307-83.
- (1944). Neural differentiation of ectoderm through exposure to saline solution. *J. exp. Zool.* **95**, 307-40.
- (1945). Neuralization and epidermization of gastrula ectoderm. *J. exp. Zool.* **98**, 161-209.
- (1947). Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis. *J. exp. Zool.* **106**, 109-222.
- (1948). Concepts on the mechanism of embryonic induction and its relation to parthenogenesis and malignancy. *Symp. Soc. exp. Biol.* **2**, 17-49.
- KUUSI, T. (1953). Sur les effets des acides nucléiques et des protéines dans l'induction hétérogène. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **64**, 190-225.
- LEHMANN, F. E. (1938). Regionale Verschiedenheiten des Organisators von Triton, insbesondere in der vorderen und hinteren Kopfregion, nachgewiesen durch phasenspezifische Erzeugung von Lithium bedingten und operativ bewirkten Regionaldefekten. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **138**, 106-58.
- NIEUWKOOP, P. D., et al. (1952). Activation and organization of the central nervous system in Amphibians. I. Induction and activation. II. Differentiation and organization. III. Synthesis of a new working hypothesis. *J. exp. Zool.* **120**, 1-108.
- OKADA, K., & TAKAYA, H. (1942). Further studies upon the regional differentiation of the inductive capacity of the organizer. *Proc. imp. Acad. Japan*, **18**, 514-19.
- & HAMA, T. (1943). Examination of regional differences in the inductive activity of the organizer by means of transplantation into ectodermal vesicles. *Proc. imp. Acad. Japan*, **19**, 48-53.
- (1944). On the different effects of the amphibian organizer following culture, transplantation and heat treatment. *Proc. imp. Acad. Japan*, **20**, 36-40.

- PASTEELS, J. (1945). Recherches sur l'action du LiCl sur les œufs des Amphibiens. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **56**, 105-83.
- (1951). Centre organisateur et potentiel morphogénétique chez les Batraciens. *Bull. Soc. zool. Fr.* **76**, 231-71.
- (1953a). Les effets de la centrifugation sur la blastula et la jeune gastrula des Amphibiens. I. Mécanisme de la formation des organes secondaires aux dépens de l'ectoblaste. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 5-24.
- (1953b). Les effets de la centrifugation sur la blastula et la jeune gastrula des Amphibiens. II. Étude comparative de la sensibilité en fonction des stades et des espèces. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 125-45.
- RAVEN, CHR. P. (1938). Über die Potenz von Gastrulaektoderm nach 24-stündigem Verweilen in äusseren Blatt der dorsalen Urmundlippe. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **137**, 661-713.
- & KLOOS, J. (1945). Induction by medial and lateral pieces of the archenteron roof, with special reference to the determination of the neural crest. *Acta neerl. morph.* **5**, 348-62.
- SPOFFORD, W. R. (1948). Observations on the posterior part of the neural plate in *Amblystoma*. II. The inductive effect of the intact posterior part of the chordo-mesodermal axis on competent prospective actoderm. *J. exp. Zool.* **107**, 123-64.
- TAKAYA, H. (1953). On the Notochord-forming potency of the prechordal plate in *Triturus Gastrulae*. *Proc. imp. Acad. Japan*, **29**, 374-80.
- TOIVONEN, S. (1940). Über die Leistungsspezifität der abnormen Induktoren im Implantatversuch bei Triton. *Ann. Acad. Sci. Fenn. Série A*, **55**, 1-150.
- (1950). Stoffliche Induktoren. *Rev. Suisse Zool.* **57**, suppl. 1, 41-56.
- (1953). Knochenmark als mesodermaler Induktor im Implantatversuch bei Triturus. *Arch. Soc. zool.-bot. fenn. Vanamo*, **7**, 113-121.
- TÖNDURY, G. (1948). Beiträge zum Problem der Regulation und Induktion in der Primitiventwicklung. *Acta anat.* **4**, 317-92.
- YAMADA, T. (1950a). Dorsalization of the ventral marginal zone of the *Triturus gastrula*. I. Ammonia-treatment of the medio-ventral marginal zone. *Biol. Bull. Wood's Hole*, **98**, 98-121.
- (1950b). Regional differentiation of the isolated ectoderm of the *Triturus gastrula* induced through a protein extract. *Embryologia*, **1**, 1-20.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Résultat de la centrifugation d'une jeune gastrula de *Rana*. (a) Coupe au niveau du rhombencéphale; dans la région ventrale on voit un complexe secondaire se composant de moelle, de somites, d'un peu de chorde, et de pronéphros. (b) Même coupe, le pronéphros secondaire à plus fort grossissement; on y remarquera deux sortes de cellules, les unes claires pauvres en plaquettes, les autres fortement chargées de plaquettes. Ces cellules vitellines sont indiquées en hachures sur le décalque de la Fig. b'.



J. PASTEELS



Factors affecting Vertebral Variation in Mice

1. Variation within an Inbred Strain

by ANNE MCLAREN and DONALD MICHIE¹

From the Department of Zoology, University College, University of London

WITH ONE PLATE

INTRODUCTION

A SURVEY by Green (1941) of skeletal types in different strains of mice revealed that whereas the C57BL strain has 6 lumbar vertebrae in over 95 per cent. of mice, there are substrains of the C3H strain which show an equally strong tendency in favour of 5 lumbar vertebrae. Russell & Green (1943) and Green & Russell (1951) have since demonstrated a marked difference between the reciprocal hybrids when the two strains are crossed, the deviation being in the maternal direction. For distinguishing between two alternative interpretations—the effects of the egg cytoplasm and the effects of the uterine environment—Green & Russell suggest that the transplantation of eggs or of ovaries may prove to be of value.

As a preliminary to attempting such transplantations we have been making a survey of vertebral type in samples of various substrains of the C3H strain. Recently Green (1953) has published a report of a similar survey which shows that two distinct vertebral types of C3H substrain exist. One of the three main substrains, C3H/He, has predominantly 6 lumbar vertebrae. (For the nomenclature of inbred strains and substrains of mice see the Committee on Standardized Nomenclature for Inbred Strains of Mice, *Cancer Research*, 1952, **12**: 602–13.) The other two—the C3H/St and C3H/Bi substrains—have predominantly 5 lumbar vertebrae.

The same conclusion has emerged from our own survey, the results of which we publish here. It will be seen that these results confirm and amplify Green's findings, and also indicate some of the factors affecting vertebral variation within C3H substrains.

MATERIALS AND METHODS

The first task was to test whether X-ray photography *in vivo* could be used to determine vertebral type with a reliability comparable to the method used in

¹ Authors' address: Department of Zoology, University College London, Gower Street, W.C.1, U.K.

the previous surveys—namely the preparation of alizarin transparencies of dead mice. Twelve C57BL and seventeen C3H/He mice, belonging to five distinct vertebral types, were classified by X-ray photography and then made into alizarin preparations and again classified. The two classifications were identical. Thenceforth all material, whether living or dead, was classified solely by X-ray photography, since this method permits the survival of classified mice for subsequent breeding.

The number of lumbar vertebrae can vary as a consequence of variation either in the number of vertebrae classified as thoracic by their articulation with ribs, or in the number classified as sacral by their articulation with the sacrum. A defect of X-ray photography is that unless great care is taken in placing the mouse on the film the ribs cannot always be counted so as to allow this distinction to be made. But the C3H strain is so constant in number of ribs, as shown by Green's (1953) survey, that this defect is assumed to be of no consequence in the present work.

We have sometimes been in doubt as to whether a transverse process should be classified as lumbar or sacral in type. In such cases we have been guided by the shape of the process and the presence of an articular surface, rather than by whether or not a functional articulation appears to exist. This decision was taken because the former criterion is less affected than the latter by slight variations in the angle at which the mouse is placed relative to the X-ray tube. Plate 1, fig. D, shows a marginal case which was actually classified as sacral although a clear space can be seen between the sacrum and the articular surface of the transverse process on the left-hand side (right side of mouse). Photographs of 6/6, 5/5, and 6/5 vertebral types are shown in Plate 1, figs. A, B, and C, for comparison (see explanation of Plate 1 for notation). The mice were placed on their backs directly on the film envelope. For live mice the procedure eventually adopted was to strap the anaesthetized mouse down with two transverse strips of cellulose tape 2 in. in width, covering the whole mouse apart from the nose and tail. The mouse will then usually remain motionless even if it recovers from the anaesthetic while still imprisoned. By this method we have photographed as many as a dozen live mice at a single exposure.

Some of our material was bred by ourselves from foundation stocks supplied by other workers, some of it was sent to us preserved; in some instances we were able to X-ray samples of living mice in the laboratories in which they were maintained, and in one case finished X-ray photographs were sent to us.

RESULTS

The new data are given in Table 1, and Green's (1953) data in Table 2. In Text-fig. 1 are set out the genealogical relationships of the various colonies from which the samples in the two bodies of data were taken. The genealogical information was elicited by personal correspondence and some of the dates given for the transfer of stocks may be subject to small errors.

In addition, data on one colony of the C3H/He substrain are set out *in extenso* in Table 3 for reasons which will be explained in the course of the discussion.

TABLE 1

New data on the distribution of vertebral types in samples of C3H mice. For each sample the top row, or rows, of figures gives the actual numbers and the bottom row gives percentages. The samples from Green, Craigie, Wilson, and Howard include descendants of the original samples raised by us

Strain	Origin	Vertebral types				Total
		5/5	6/5	5/6	6/6	
C3H/St	Strong in 1953	24	4	1	9	38
		63.2	10.5	2.6	23.7	100.0
C3H/St	Wilson in 1952	64	1	0	0	65
		98.5	1.5	0.0	0.0	100.0
C3H/Bi	Green in 1952 ♀♀	10	0	0	0	10
		♂♂	19	0	0	19
		both sexes	29	0	0	29
			100.0	0.0	0.0	100.0
C3H/Bi	Dmochowski in 1953	18	3	1	4	26
		69.2	11.5	3.8	15.4	99.9
C3H/Bi	Foulds in 1951	22	0	2	2	26
		84.6	0.0	7.7	7.7	100.0
C3H/Bi	Craigie in 1953 ♀♀	12	6	1	4	23
		♂♂	41	2	0	44
		both sexes	53	8	4	67
			79.1	11.9	6.0	100.0
C3H/Bi	Woodhouse in 1953	23	1	0	0	24
		95.8	4.2	0.0	0.0	100.0
C3H/He	Hewitt in 1951	6	0	0	23	29
		20.7	0.0	0.0	79.3	100.0
C3H/He	Paterson in 1952	0	1	1	28	30
		0.0	3.3	3.3	93.3	99.9
C3H/He	Heston in 1953 ♀♀	0	1	0	14	15
		♂♂	0	1	14	15
		both sexes	0	1	28	30
			0.0	3.3	93.3	99.9
C3H/He	Howard in 1950 ♀♀	6	1	0	54	61
		♂♂	10	7	67	85
		both sexes	16	8	121	146
			11.0	5.5	82.9	100.1

TABLE 2

Green's (1953) data on the distribution of vertebral types in samples of C3H mice. Some alterations from his Table 1 have been made in order to make the terminology consistent with our Table 1. For each sample the top row of figures gives the actual numbers reconstructed from the percentages given in the bottom row

Strain	Origin	Vertebral types			Total
		5/5	6/5 and 5/6	6/6	
C3H/St	Strong in 1937	192	6	2	200
		96	3	1	100
C3H/Bi	Bittner in 1939 (= Bittner's Z)	743	15	8	766
		97	2	1	100
C3H/He	Law in 1948	3	3	170	176
		2	2	96	100
C3H/HeJax	Jackson in 1950	0	1	29	30
		0	3	97	100
C3H/HeRl	Russell in 1950 (Oak Ridge)	1	2	69	72
		1	3	96	100
C3H/Bi	Bittner in 1950 (= Bittner's Z)	134	9	1	144
		93	6	1	100
C3Hf/Bi	Bittner in 1950 (= Bittner's Zb)	66	1	8	75
		88	1	11	100
C3H/StWi	Wilson in 1952	7	0	0	7
		100	0	0	100

DISCUSSION

The family tree shown in Text-fig. 1 makes it clear that in general the new data confirm and consolidate Green's (1953) findings. All samples fall decisively into one or other of the two contrasted types: none occupies an intermediate position. The type to which any sample belongs is related to its history in the manner indicated by Green: all samples appearing in the left-hand sector of Text-fig. 1 have predominantly 6 lumbar vertebrae, while all samples whose ancestors followed the other pathway at the 1930 bifurcation have predominantly 5 lumbar vertebrae.

In Green's (1953) report of his survey he comments:

On the assumption that the difference is genetic, the following are possibilities. (1) The original C3H mice may have been heterozygous for one or more pairs of genes affecting skeletal type. By inbreeding, different genetic combinations may have become fixed in different sublines. The heterozygosity would have had to continue in the line at least until the Andervont subline was established in 1930. (2) One or more mutations

of skeletal genes may have occurred following the separation of the Andervont subline, leading thereby to the establishment of different types in the existing sublines. (3) One of the sublines may have been genetically contaminated by an accidental and unrecorded mating outside the line. (4) Some other strain may erroneously have been labelled as C3H.

TABLE 3
Data on a colony of the C3H/He substrain

Litter	Not 6/6	X-rayed total	Litter size	Birth order	Maternal age (weeks)	Litter	Not 6/6	X-rayed total	Litter size	Birth order	Maternal age (weeks)
1147-54	3	5	8	1	9	21	0	2	6	1	10
1175-82	2	3	8	1	9	23	0	2	4	1	9
1183-88	0	3	6	1	10	26	0	3	3	1	9
1214-21	0	8	8	1	9	27	0	2	4	1	9
1222-27	0	5	6	1	9	28	0	1	5	1	11
1228-34	0	6	7	1	10	30	0	2	7	1	11
1235-36	1	2	2	1	8	40	0	1	7	1	10
1237-44	0	5	8	1	10	42	0	1	3	1	9
1250-56	0	2	7	1	10	47	0	1	3	1	12
1257-64	0	5	8	1	9	48	0	2	4	2	12
1265-71	1	6	7	1	9	57	1	1	4	1	12
1272-75	0	2	4	1	11	63	0	1	3	2	14
1276-83	0	5	8	1	11	70	0	4	4	1	13
1284-89	1	6	6	1	10	297	0	1	4	1	9
1290-98	0	8	9	1	10	302	0	1	8	2	17
1299-1304	0	1	6	1	9	318	2	3	6	3	20
1305-10	0	1	6	1	10	396	3	4	7	2	19
1311-18	0	1	8	1	10	397	1	4	5	1	19
1319-27	0	5	9	1	11	413	0	2	3	4	23
1328-33	3	6	6	1	9	422	1	4	7	3	26
1334-41	1	3	8	1	12	451	3	3	3	1	14
1342-49	1	6	8	1	9	516	0	5	5	2	25
20	0	1	1	1	9	588	1	1	4	2	14

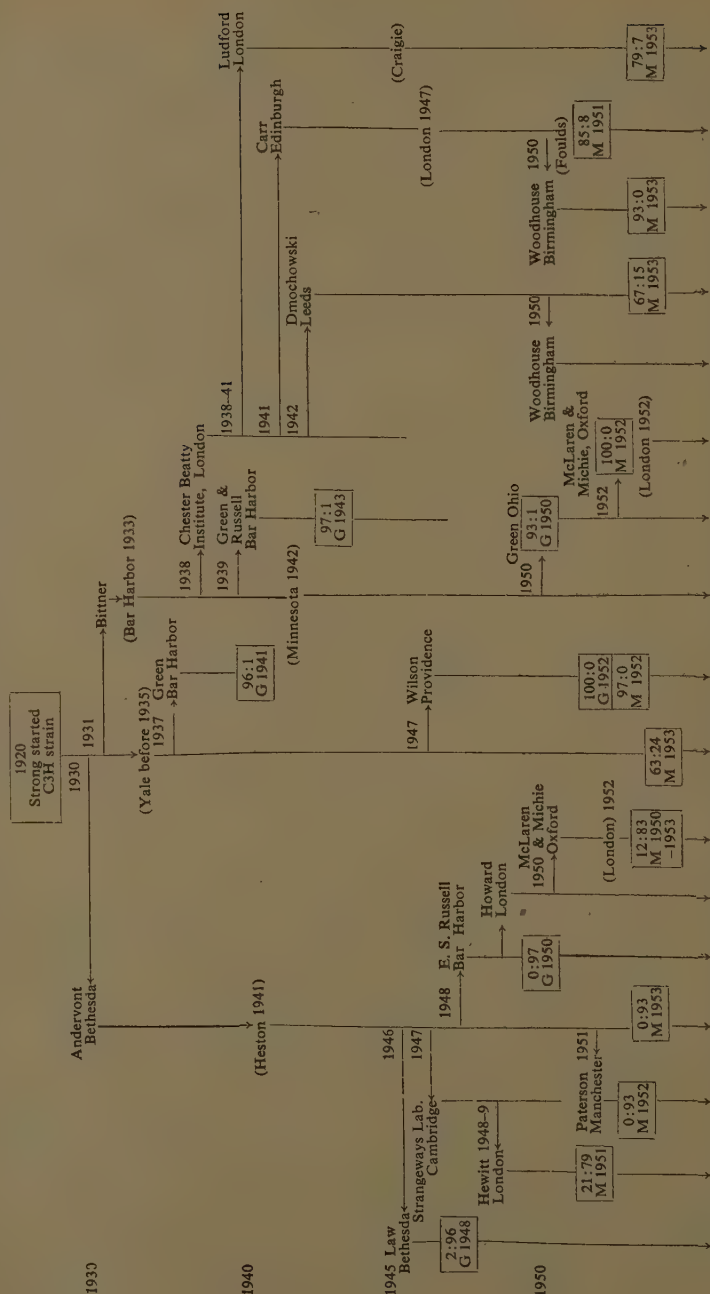
Effects of birth order: $\chi^2_{(1)} = 2.366$,
maternal age: $\chi^2_{(1)} = 2.372$,
litter size: $\chi^2_{(1)} = 1.278$.

The new data can do little towards clarifying this question. They do, however, demonstrate, as is evident from Text-fig. 1, that the difference shows itself in a consistent manner over a wide range of colonies maintained in different laboratories in both England and America, thus confirming that the difference is genetic.

In addition to this major difference, some subsidiary vertebral variation within the C3H strain has shown itself in the present survey. The following three causal factors appear to be involved:

- A correlation between litter-mates. Individuals of anomalous vertebral type are not distributed at random among litters within a colony, but tend to be 'clumped' in particular litters.
- A sex difference. The percentage of mice with 5 lumbar vertebrae tends to be higher among males than among females.
- Divergences attendant on the formation of new colonies within substrains.

GENEALOGICAL TABLE OF THOSE COLONIES OF THE C3H STRAIN OF WHICH SAMPLES HAVE
BEEN CLASSIFIED FOR VERTEBRAL TYPE



TEXT-FIG. 1. In each 'box' is given: first the frequencies of various vertebral types found in the sample, second an initial denoting the author of the information, and third the year in which the sample was surveyed, or, if this is unknown, the year of publication.

G = Green. M = McLaren and Michie.

$x:y = x\% 5/5, y\% 6/6$ and $(100 - x - y)\%$ asymmetrical.

'Clumping' within litters

In Green & Russell's (1951) data a significant heterogeneity appears between the progenies of different matings within the C3H $\times$ C57 and C57 $\times$ C3H mating types. The authors did not specifically inquire whether heterogeneity was also present between litters of the same mating, and their data and calculations are not presented in a form appropriate for answering this question. Such heterogeneity (which implies that the anomalous individuals are clumped into particular litters) can arise if the expression of the character is affected by factors of the maternal physiology which change with time—either systematically, as in the case of polydactyly in mice described by Holt (1948), or in a fluctuating manner as in the case of a tooth defect in the CBA strain of mice described by Grüneberg (1951).

Our data, set out in Table 3, on one colony of the C3H/He substrain are extensive enough to test heterogeneity between litters. The χ^2 appropriate to the detection of heterogeneity between the 33 litters containing two or more classified mice each, has 32 degrees of freedom and a value of 62.846. We can take $\sqrt{2\chi^2 - \sqrt{(2n - 1)}}$ as a normal deviate with unit variance (Fisher, 1925-50, Table 3). This expression has a value of 3.27 in the present case, which corresponds to $P \simeq 6 \times 10^{-4}$ using Good's (1950) approximation. This procedure is subject to considerable error in the present case where the expectations in most of the classes are very small. A closer approach to a normal deviate can be obtained by calculating Haldane's (1945) statistic $\hat{\xi}$. It has the value 3.90 in the present case, for which Good's approximation gives $P \simeq 5 \times 10^{-5}$. The litter-mate correlation, or clumping tendency, is therefore highly significant.

Does this reflect heterogeneity between *matings* within the colony, or between

TABLE 4

Distribution of vertebral types in successive litters from two matings in a colony of C3H/He mice. P is calculated by Fisher's (1925-50; § 21.02) exact method

		Vertebral types		Test of homogeneity between successive litters <i>P</i>
		6/6	Not 6/6	
Mating H506 {	1st litter	0	3	1/56
	2nd litter	5	0	
Mating H454 {	2nd litter	1	3	17/70
	3rd litter	3	1	

litters within the same mating? The sample of mice classified was not chosen with this question in mind, and is unsatisfactory in that the 33 litters were derived from 31 separate matings. However, the two matings from which we have data on more than one litter suggest that the clumping is due at least in part to pre-natal factors which influence all the members of a litter in the same way, but which vary from litter to litter within the same mating (see Table 4).

The variation of these prenatal factors is not related in a systematic way either to birth order, to maternal age, or to litter size. As shown at the foot of Table 3, the χ^2 value testing regression, calculated as in Holt's (1948) paper, is in each case small, having in mind the large χ^2 value for overall heterogeneity. It is concluded that the operative factors of the maternal physiology are probably of the fluctuating rather than the systematic type.

Before leaving the analysis of this sample it is perhaps worth noting that the variation of the two sides is positively correlated ($\chi^2_{(1)} = 78.578$) and that (see Table 1) the 6/5 type significantly predominates over the 5/6 type of asymmetry ($P < 0.02$). This and all other 2×2 χ^2 values have been calculated using Yates's correction for continuity (Fisher & Yates, 1938-53).

The sex difference

Green & Russell (1951) showed that there was a highly significant sex difference in vertebral type among the offspring of their C3H $\times$ C57BL and C57BL $\times$ C3H crosses. The percentage of mice with 5 lumbar vertebrae was higher among the males than among the females. 966 fully classified offspring of C3H matings (which are in fact the same mice as those shown in the first two samples in Green's data given in Table 2) showed a small sex difference in the same direction. This difference, as shown in Table 5, gives a $\chi^2_{(1)}$ of 9.442. We cannot regard

TABLE 5

The sex distribution of vertebral type in two samples of C3H mice

	5/5	Not 5/5	Total
♀♀	466	24	490
♂♂	470	6	476
Total	936	30	966

Green & Russell's pooled sample. $\chi^2_{(1)} = 9.442$

	5/5	Not 5/5	Total
♀♀	12	11	23
♂♂	41	3	44
Total	53	14	67

The sample from Craigie. $\chi^2_{(1)} = 12.986$

this as statistically significant confirmation of a sex difference *within* the C3H strain because the interpretation of χ^2 is obscured by the clumping effect. As we have seen, this effect is liable to inflate the variance to about double the theoretical binomial variance assumed in the construction of tables of χ^2 —since in the sample analysed above, χ^2 divided by the number of degrees of freedom = $62.846/32 = 1.964$. We cannot simply divide χ^2 by this factor in order to get a 'corrected' value, since our estimate of the factor is itself subject to sampling

error; and even if it were not, we cannot expect the variance to be inflated by clumping to the same degree in different colonies and substrains which may differ in their characteristic percentage of anomalies.

But it seems reasonable to regard as formally significant a $\chi^2_{(1)}$ value which is three or four times the conventional 5 per cent. probability level, and as certainly significant any $\chi^2_{(1)}$ value exceeding, say, 20.

With this in mind let us consider the new data. It contains four samples in which the sexes were distinguished—Howard's, Craigie's, Green's, and Heston's (see Table 1). In the first two there is a sex difference, again in the same direction. The χ^2 relating to Howard's mice is not significant, but the value of 12.986 for Craigie's (see Table 5) is sufficient, when taken in conjunction with the data of Green & Russell discussed above, to establish to our satisfaction that there is a real effect of sex on vertebral variation within the C3H/Bi substrain.

Divergences between colonies

Within that part of the C3H strain which remained with Strong in 1930 and which has predominantly 5 lumbar vertebrae, there are three colonies included in the new data which can be shown to differ significantly from the pooled sample of Green & Russell (1951). They are Craigie's and Dmochowski's (C3H/Bi) colonies and Strong's (C3H/St) colony, all of which show a lower percentage of the 5/5 type than Green & Russell's sample.

Table 6 shows that for males the difference between Craigie's and Green & Russell's mice is not significant, but that for females the difference is highly significant ($\chi^2_{(1)} = 57.110$), even allowing for any reasonable degree of clumping.

The comparison with Dmochowski's mice is made more difficult by the fact that this material was not classified for sex. But even if we make the assumption which is least favourable to the demonstration of a difference, namely that our sample of Dmochowski's colony consisted entirely of females, the comparison with Green & Russell's females, as shown in Table 6, yields a $\chi^2_{(1)}$ of 24.136.

A similar comparison for Strong's mice, which were also not classified for sex, gives a $\chi^2_{(1)}$ of 49.202.

These results might be interpreted as showing that genetical divergences have occurred within the C3H strain in addition to that between the C3H/He substrain on the one hand and the C3H/St and C3H/Bi substrains on the other. This interpretation should be treated with caution for the following reasons.

The difference demonstrated by Green & Russell between the offspring of reciprocal crosses between the C3H and C57BL strains shows that at least for some genotypes the vertebral character under study is highly sensitive to the uterine environment in which prenatal development occurs. The clumping effect which we have demonstrated in a sample of the C3H/He substrain shows that this sensitivity characterizes pure-strain C3H mice as well as strain-hybrids. It also suggests that the character is sensitive not only to factors of the uterine environment which are determined by the mother's genotype but also to factors

which fluctuate during the mother's lifetime. It is reasonable to assume that some of these factors of the maternal physiology are affected by environmental influences, such as diet, in which some laboratory colonies differ from others. In this connexion we may cite the observation of Searle (1954) that a number of skeletal characters are profoundly affected by changes in the mother's diet. It

TABLE 6

The comparison of the samples from Craigie, Dmochowski, and Strong with Green and Russell's pooled sample

♂♂	5/5	Not 5/5	Total
Craigie	41	3	44
Green & Russell . .	470	6	476
Total	511	9	520

$$\chi^2_{(1)} = 4.412$$

♀♀	5/5	Not 5/5	Total
Craigie	12	11	23
Green & Russell . .	466	24	490
Total	478	35	513

$$\chi^2_{(1)} = 57.110$$

	5/5	Not 5/5	Total
Dmochowski	18	8	26
Green & Russell ♀♀ . .	466	24	490
Total	484	32	516

$$\chi^2_{(1)} = 24.136$$

	5/5	Not 5/5	Total
Strong	24	14	38
Green & Russell ♀♀ . .	466	24	490
Total	490	38	528

$$\chi^2_{(1)} = 49.202$$

follows that although the major difference between the two main sections of the C3H line is without doubt mainly genetic, the subsidiary differences which the new data have revealed within one of these two sections might reflect differences in the conditions under which different colonies are maintained rather than differences in genotype.

Since the above was written, evidence has been privately communicated to us by Dr. D. Hamer that some differences between fairly recently separated colonies of the C3H strain may be genetically determined. Dr. Hamer has been working in the laboratories of Dr. D. L. Woodhouse in Birmingham on the activity of

β -glucuronidase in mouse liver. Inbred strains of mice fall into two distinct groups with respect to this character, those with 'high' and those with 'low' activity. Two C3H/He, one C3H/St, and three C3H/Bi colonies have been shown all to belong to the 'low' group. However, Dr. Hamer finds that of the two colonies of C3H/Bi mice maintained in Birmingham (see Text-fig. 1), the one from Leeds is 'low' but the other, from London, is 'high'. These colonies had at the time of testing been maintained in the same laboratory for nearly 4 years, and hence the difference must be attributed to a genetic divergence. This divergence must have arisen between 1941, the year in which they were separated, and 1950, since the colony maintained by Dr. Foulds in London is also 'high'.

SUMMARY

1. By means of X-ray photography the number of lumbar vertebrae was counted in samples of mice from 11 colonies of the C3H inbred strain.

2. The results confirm Green's (1953) finding that, of the three main substrains of the C3H strain, one (C3H/He) has predominantly 6 lumbar vertebrae while the other two (C3H/St and C3H/Bi) have predominantly 5 lumbar vertebrae.

3. In addition, the new data have revealed three factors with significant effects on vertebral variation *within* substrains of the C3H strain:

- i. A fluctuating variable of the mother's physiology which affects the pre-natal development of the offspring.
- ii. A difference between the sexes. The percentage of mice with 5 lumbar vertebrae is higher among males than among females.
- iii. Divergences between colonies of the same substrain. The available data are not competent to distinguish the relative contributions to these divergences of nature and nurture.

Note added in proof. An extensive survey by Searle (*J. Genet.* **52**, 68–102, (1954)) of skeletal variation within the A and C57BL strains has just appeared. In the section on lumbo-sacral variation within the C57BL/Gr substrain Searle finds significant effect of all the factors which we have reported here as affecting variation within substrain of C3H mice—namely subline, litter, sex, side and between-side correlation. He also reports an effect of maternal age.

ACKNOWLEDGEMENTS

In addition to the many workers both in Britain and in the U.S.A. who have helped us to elucidate the history of the C3H strain of mice, we wish especially to thank the following: for X-ray photography, Mr. P. Venning (University College London) and Dr. G. M. Ardran (Nuffield Institute of Medical Research, Oxford); and for material and facilities for classifying samples of their mouse colonies, Dr. J. Craigie (Imperial Cancer Research Fund, London), Dr. L.

Dmochowski (University of Leeds), Dr. L. Foulds (Chester Beatty Research Institute, London), Dr. E. L. Green (Ohio State University, U.S.A.), Dr. W. E. Heston (National Institute of Health, Bethesda, U.S.A.), Dr. H. B. Hewitt (Westminster School of Medicine, London), Dr. Alma Howard (M.R.C. Radiotherapeutic Research Unit, Hammersmith Hospital, London), Dr. Edith Paterson (Christie Hospital and Holt Radium Institute, Manchester), Dr. L. C. Strong (Roswell Park Memorial Institute, New York), Dr. J. W. Wilson (Brown University, U.S.A.), and Dr. D. L. Woodhouse and Dr. D. Hamer (University of Birmingham).

We also wish to thank Professor P. B. Medawar, F.R.S., Professor J. B. S. Haldane, F.R.S., Dr. H. Grüneberg, and Dr. E. L. Green for reading this paper in draft.

We are grateful to the Agricultural Research Council for financial support for the main part of this work, and to the Royal Society for an expenses grant to one of us (A. McL.) in the preliminary stages.

REFERENCES

- FISHER, R. A. (1925-50). *Statistical Methods for Research Workers*. Edinburgh: Oliver and Boyd.
 — & YATES, F. (1938-53). *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*. Edinburgh: Oliver and Boyd.
 GOOD, I. J. (1950). *Probability and the Weighing of Evidence*. London: Charles Griffin.
 GREEN, E. L. (1941). Genetic and non-genetic factors which influence the type of the skeleton in an inbred strain of mice. *Genetics*, **26**, 192-222.
 — (1953). A skeletal difference between sublines of the C3H strain of mice. *Science*, **117**, 81-82.
 — & RUSSELL, W. L. (1951). A difference in skeletal type between reciprocal hybrids of two inbred strains of mice (C57 blk and C3H). *Genetics*, **36**, 641-51.
 GRÜNEBERG, H. (1951). The genetics of a tooth defect in the mouse. *Proc. roy. Soc., B*, **138**, 437-51.
 HALDANE, J. B. S. (1945). The use of χ^2 as a test of homogeneity in a $(n \times 2)$ -fold table when expectations are small. *Biometrika*, **33**, 234-8.
 HOLT, S. B. (1948). The effect of maternal age on the manifestation of a polydactyl gene in mice. *Ann. Eugen., Lond.* **14**, 144-57.
 RUSSELL, W. L., & GREEN, E. L. (1943). A skeletal difference between reciprocal F_1 hybrids from a cross of two inbred strains of mice (abstract). *Genetics*, **28**, 87.
 SEARLE, A. G. (1954). Genetical studies on the skeleton of the mouse. XI. The influence of diet on variation within pure lines. *J. Genet.* **52**, 413-24.

EXPLANATION OF PLATE

FIG. A. C3H/He ♀ illustrating 6/6 vertebral type.

FIG. B. C3H/He ♀ illustrating 5/5 vertebral type.

FIG. C. C3H/He ♂ illustrating 6/5 vertebral type.

FIG. D. F_1 ♂ from C57BL ♀ × C3H/Bi ♂ mating, illustrating a marginal case (see text).

The symbol 6/5 means that the mouse has 6 lumbar vertebrae on its left side and 5 on its right, while 5/6 denotes the reverse type of asymmetry.



A. McLAREN & D. MICHIE

Recherches préliminaires sur les chimères d'organes embryonnaires d'oiseaux et de mammifères en culture *in vitro*

(Mémoire dédié à M. le Professeur F. Baltzer, de l'Université de Berne,
à l'occasion de son 70^e anniversaire)

par ÉTIENNE WOLFF et J.-P. WENIGER¹

Laboratoire d'Embryologie expérimentale de la Faculté des Sciences de Strasbourg

AVEC DEUX PLANCHES

INTRODUCTION

LA nouvelle technique de culture d'organes *in vitro*, mise au point dans notre laboratoire (Et. Wolff & K. Haffen, 1952 *a* et *b*), permet d'analyser les possibilités de différenciation d'organes, en l'absence de toutes corrélations. Elle permet en outre d'associer des organes dont on veut étudier les interactions. Ces organes peuvent être de nature différente. On peut par exemple associer un ovaire et un testicule (1952c), une thyroïde et une hypophyse. Nous proposons d'appeler associations *homologues* des associations d'organes de même nature, associations *hétérologues* des associations d'organes de nature différente. On peut tenter d'associer des organes appartenant à des races, à des espèces, à des ordres ou à des classes différentes. D'après la terminologie déjà employée dans les recherches sur les greffes, nous appellerons *hétéroplastiques* des associations d'organes d'espèces différentes, *xénoplastiques* des associations d'organes provenant de groupes zoologiques plus éloignés.

On peut encore tenter d'associer des organes de même nature, mais d'âges différents, par exemple un organe embryonnaire et un organe adulte, ou deux organes à deux stades différents de leur développement embryonnaire. Nous donnerons à ces associations le nom de *parabioses anachroniques*.

Il est possible d'envisager des combinaisons plus ou moins complexes, par exemple des associations *hétérogènes anachroniques* et *xénoplastiques*, où deux organes associés diffèreraient par leur nature, leur âge, leur appartenance à un groupe zoologique.

¹ *Authors' address:* Laboratoire d'Embryologie expérimentale de la Faculté des Sciences, 12 rue de l'Université, Strasbourg, France.

Les unes ou les autres de ces associations sont-elles possibles? Nous ne le savons pas *a priori*, sauf dans le cas de parabioses hétérologues, où des recherches ont déjà apporté de nombreux résultats (1952 *c* et *d*). Mais la question se pose pour les associations xénoplastiques et les associations anachroniques. Dans cet article nous envisagerons uniquement les associations xénoplastiques de gonades.

Nous avons mis en contact des gonades de souris et d'oiseau, afin de résoudre deux problèmes principaux.

1° — L'association entre deux organes de classes différentes est-elle techniquement possible? Observe-t-on une fusion des deux unités, ou y a-t-il incompatibilité entre elles? Dans les cas où une coalescence des deux organes se produit, quels sont les tissus qui entrent en contact, quelles sont les réactions des tissus étrangers mis en présence, et jusqu'à quel point leur interpénétration est-elle possible?

2° — Une jeune gonade embryonnaire a-t-elle une action sur la différenciation sexuelle d'une gonade de l'autre espèce, dans le cas où elles sont de sexe génétique opposé, à l'image de ce qu'on obtient chez les Oiseaux?

Nous ne donnons dans cet article que quelques résultats relatifs au premier problème, la compatibilité ou l'incompatibilité de deux organes de classes différentes. Bien qu'aucun travail antérieur ne se soit appliqué directement à ce problème, en utilisant les techniques de culture, les recherches sur les greffes embryonnaires autorisaient notre espoir. Ainsi Nicholas & Rudnick (1933) avaient montré qu'on peut greffer sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon d'Oiseau des fragments d'organes de Mammifères. Par ailleurs de nombreuses recherches sur les Batraciens, auxquelles Baltzer (1940, 1941, 1950) a apporté une contribution particulièrement importante, montraient la vitalité des chimères d'espèces, de genres ou d'ordres différents, dans certaines conditions expérimentales et jusqu'à certains stades du développement. Nos recherches démontrent sans ambiguïté la tolérance mutuelle des gonades embryonnaires d'Oiseau et de Mammifère. Elles établissent dans quelle mesure leurs tissus s'associent et dans certains cas s'interpénètrent.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Nous avons utilisé des gonades provenant, d'une part d'embryons de souris prélevées entre le 13^{ème} jour et le 16^{ème} jour de la gestation, d'autre part de gonades d'embryons de canard prélevées entre le 8^{ème} jour et le 11^{ème} jour de l'incubation. Après avoir été soigneusement disséquées et préparées dans le liquide de Tyrode, elles sont associées sur le milieu 'standard', préparé suivant la technique d'Et. Wolff & K. Haffen (1952 *a* et *b*). Nous avons associé deux à deux des partenaires de même sexe ou de sexes différents. Dans les premières expériences, les organes ont été placés côte à côte, dans le sens de leur plus grande longueur. Dans la suite, nous avons été amenés à les couper en deux et à les mettre en contact par leur surface de section, afin de faciliter leur coalescence. Dans certains cas, une gonade a été interposée en 'sandwich' entre les deux frag-

ments de l'autre. Les explants associés ont été cultivés sur le milieu nutritif pendant une durée de 4 à 7 jours. Ils sont lavés et repiqués, toutes les fois que cette opération s'est révélée nécessaire, en moyenne après 2 à 3 jours de culture. Les organes ont été fixés au liquide de Bouin, puis débités en coupes de 5μ et colorés à l'hémalum-éosine.

I. *Associations testicule canard-testicule souris*

Des testicules de canard de 7 à 9 jours d'incubation ont été associés à des testicules de souris, prélevés entre le 13^{ème} et le 14^{ème} jour de la gestation. Les testicules de canard, explantés avant le 10^{ème} jour, montrent souvent, après 5 à 6 jours d'association avec les testicules de souris, un épithélium germinatif épais, à hautes cellules, qui n'existe pas chez les témoins (Planche 1, fig. B). La persistance de cet épithélium est due vraisemblablement à l'action de l'explant de souris, qui, bien que de nature testiculaire, pourrait exercer une action féminisante sur la gonade encore indifférente de canard. L'interprétation de ce phénomène n'entre pas dans le cadre de cette étude. Notons seulement que cet épithélium recouvre parfois non seulement le testicule de canard, mais encore une grande surface du testicule de souris.

Lorsque l'explant de canard a été prélevé après le 10^{ème} jour d'incubation, l'épithélium germinatif est réduit à une mince couche de cellules très plates, comme dans le développement normal (Planche 1, fig. A).

Dans les deux cas, on observe, sous l'épithélium de canard, une migration très importante de cellules conjonctives de souris, qui soulignent la basale de l'épithélium, quand celui-ci est épais (Planche 1, fig. B). Ces cellules, reconnaissables à leur forte basophilie, s'insinuent entre la basale de l'épithélium et les tubes testiculaires, et dans les espaces situés entre les tubes testiculaires. On retrouve parfois de telles cellules à de grandes distances de leur point de départ.

Dans la région où les deux testicules sont soudés, certains tubes de souris et de canard se terminent en culs-de-sac; ils sont adossés les uns aux autres et ne communiquent pas. Ils sont parfois séparés par une barrière conjonctive à laquelle participent aussi bien les cellules de canard que celles de souris. Mais dans certaines régions, les tubes des deux espèces *communiquent* largement entre eux. On voit les boyaux de canard s'enfler et se continuer directement dans les ampoules testiculaires de souris (Planche 1, fig. A et C). L'épithélium de Sertoli est constitué de cellules des deux espèces dans la zone de passage. Les noyaux, régulièrement disposés perpendiculairement à la membrane basale, se distinguent aisément par leur taille et leur coloration. Ils sont très basophiles et ellipsoïdes chez la souris, plus petits, beaucoup plus clairs et arrondis, chez le canard (Planche 1, fig. C).

À l'intérieur de ces tubes mixtes, on voit coexister des spermatogonies des deux espèces, mais surtout des spermatogonies de souris, les testicules de canard étant souvent peu fertiles dans les cultures. La différence entre les deux sortes de

spermatogonies est frappante. Chez la souris, elles ont un protoplasme acido-phile avec un gros noyau à chromatine poussièreuse; chez le canard, leur protoplasme est peu colorable, leur noyau est clair avec une chromatine filamenteuse adossée à la membrane (Planche 1, fig. D). On ne voit aucun signe d'incompatibilité ni entre les cellules germinales ni entre les cellules somatiques des deux espèces. Elles sont aussi saines dans les tubes mixtes que dans les tubes normaux.

Dans toute la région commune aux deux formations, le contact est assuré, entre les tubes testiculaires, par une association très intime des tissus conjonctifs des deux espèces.

II. *Associations ovaire de souris-ovaire de canard*

Des ovaires d'embryons de canard, prélevés entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour d'incubation, ont été associés à des ovaires embryonnaires de souris de 12 à 16 jours. Les deux gonades, prélevées après 4 à 7 jours de culture, forment un ensemble indissociable. La tendance générale que montrent ces associations est l'intrication des couches profondes des deux ovaires. L'épithélium germinatif, très épais, du cortex de cane, tend à recouvrir une partie de l'ovaire de souris (Planche 1, fig. E). Dans un cas, la gonade de souris, intercalée au début de l'expérience entre deux fragments d'ovaire de cane, occupe la place de la médullaire et des cordons de Pflüger du partenaire et se trouve entièrement recouverte par l'épithélium cortical de celui-ci (Planche 2, fig. F).

Dans les autres cas, les nids à ovocytes ou à ovogonies des deux partenaires sont intriqués. Les cordons sexuels s'interpénètrent, des cellules somatiques de souris pénètrent profondément dans les nids à ovogonies et les cordons médullaires de canard. Les gonocytes demeurent en général dans leur gonade respective, en certains points ils pénètrent dans le territoire étranger, et il n'existe aucune limite nette entre les deux zones (Planche 2, fig. G). Des cellules germinales des deux espèces voisinent dans le même milieu de cellules somatiques.

III. *Associations ovaire de souris-testicule de canard*

Nous avons associé des ovaires de souris de 12 à 16 jours de vie foetale à des gonades mâles de canard prélevées entre le 9^{ème} et le 10^{ème} jour d'incubation.

Quand la gonade de souris est explantée au stade indifférencié ou tout au début de sa différenciation en testicule, elle s'entoure d'un épithélium germinatif épais, évoquant un jeune cortex ovarien (Planche 2, fig. H). Nous n'envisageons pas dans ce travail d'expliquer les causes de cette réaction de la gonade mâle. Cette intersexualité apparente est-elle due à la sécrétion normale de l'ovaire de souris? C'est ce que nous étudierons dans des travaux ultérieurs.

Les deux gonades sont intimement soudées sur une large surface. Les tissus somatiques s'interpénètrent profondément. Des cellules végétatives des cordons ovariens, à noyaux arrondis, se répandent entre les tubes testiculaires. Des cellules conjonctives s'insinuent sous la basale de l'épithélium cortical, auquel elles forment une doublure presque continue (Planche 2, fig. H). On en retrouve à de

grandes distances de leur source, dans des régions du testicule qui n'ont pas de contact direct avec l'ovaire. On peut parler d'une invasion de la gonade de canard par des cellules de l'ovaire de souris.

Cette migration se reconnaît aisément à la différence de coloration que manifestent les noyaux de canard et les noyaux de souris. Ceux-ci sont beaucoup plus compacts et basophiles. Peut-être y a-t-il une pénétration inverse des noyaux de canard dans l'ovaire de souris; mais celle-ci est plus difficile à reconnaître, à cause de la densité des cellules de l'ovaire et de leur intense coloration.

Dans certains cas, l'épithélium germinatif de canard recouvre une partie de l'ovaire de souris. On voit parfois des ovocytes se loger dans cet épithélium comme le font les gonocytes de canard. Dans d'autres cas, les ovocytes de souris pénètrent, de même que les cellules folliculeuses, dans les tubes testiculaires de canard (Planche 2, fig. I). On les voit alors logés dans la cavité de ces tubes, sans qu'ils montrent aucun signe de dégénérescence.

IV. *Associations ovaire de canard-testicule de souris*

Les deux organes sont intimement soudés, leurs tissus somatiques s'enchevêtrent dans la zone de contact. Les cellules conjonctives de souris, comme dans l'association inverse, s'insinuent entre les tissus de canard. Mais on observe en outre une remarquable adaptation entre les cordons fertiles des deux espèces. Les cordons de Pflüger s'ouvrent et se prolongent insensiblement dans les tubes testiculaires, où ils paraissent déverser leurs ovogonies. Ainsi l'on voit des tubes testiculaires de souris, où voisinent indifféremment des ovogonies de canard et des spermatogonies de souris (Planche 2, fig. J). L'on peut même rencontrer, en pleine masse testiculaire de souris, des sections de tubes contenant exclusivement des ovogonies de canard (Planche 2, fig. K), à côté de tubes normalement peuplés des spermatogonies de l'espèce.

Inversement, des spermatogonies de souris pénètrent dans le cortex de canard, soit dans les îlots à ovogonies, soit dans la profondeur de l'épithélium germinatif, où elles voisinent avec les cellules germinales de canard.

CONCLUSIONS

Les associations de gonades embryonnaires d'Amniotes de classes zoologiques différentes montrent qu'il n'y a aucune incompatibilité entre les tissus des deux partenaires. Dans toutes les combinaisons éprouvées ($\sigma\sigma$, $\varphi\varphi$, $\varphi\sigma$ et $\sigma\varphi$), les deux explants se soudent intimement, leurs tissus s'interpénètrent, montrant parfois de grandes affinités. C'est ainsi que, dans les quatre combinaisons possibles, les tissus conjonctifs s'entremêlent, formant un large pont mitoyen. En outre, le conjonctif de souris est capable de migrer très loin dans les explants de canard qu'il colonise: il s'insinue sous les épithéliums et dans les espaces entre les cordons.

Dans certains cas, les cordons ou les tubes eux-mêmes entrent en contact. Par exemple des tubes testiculaires de canard s'ouvrent dans les tubes de souris.

Ainsi des tubes mixtes s'édifient, où les épithéliums sertoliens sont en continuité, où les gonocytes des deux espèces voisinent. Si l'on examine de plus près la paroi de tels tubes, on voit, en certains points, une alternance entre les cellules des deux espèces.

On peut donc parler non seulement de tolérance entre les tissus des deux espèces, mais aussi d'une véritable affinité de certaines cellules pour l'organe étranger. Trois possibilités pouvaient se présenter *a priori* dans de telles expériences: l'incompatibilité, l'indifférence, l'affinité.

Dans l'hypothèse de l'incompatibilité, on devrait voir les gonades affrontées refuser tout contact, se fermer sur elles-mêmes, ou bien, après une fusion passagère, leurs cellules se nécroser dans le milieu étranger.

Dans l'hypothèse de l'indifférence, les organes associés entreraient en rapport, leurs cellules se mêleraient dans la région de contact, mais les deux organes garderaient dans leur ensemble leur autonomie et leur individualité.

Enfin dans l'hypothèse de l'affinité, des tissus de l'une des gonades pénétreraient dans l'autre et s'associeraient aux tissus étrangers suivant certaines modalités constantes.

Ce sont les deux dernières hypothèses qui se sont vérifiées. Il est difficile de se prononcer, dans certains cas, entre l'indifférence et l'affinité. Lorsque les cordons sexuels s'abouchent et se mettent en rapport, il est vraisemblable que leurs contacts sont accidentels et que leurs cellules tendent à cicatriser la plaie ouverte en profitant des voies qui leur sont offertes. Ainsi, elles pénètrent dans les parties les plus proches de l'explant étranger; elles reforment les ensembles structuraux dont elles font partie et elles s'associent, à l'occasion, aux structures homologues d'une autre classe. Il est tout de même remarquable que des cellules de canard obéissent aux lois structurales d'un tissu de souris et réciproquement: ainsi les cellules de Sertoli 'se reconnaissent' entre elles, si l'on peut s'exprimer ainsi. Mais de telles associations sont limitées aux régions de contact; encore faut-il qu'il y ait une brèche ouverte dans l'un ou l'autre explant. Lorsque les cordons sont terminés en cul-de-sac, ils n'entrent pas en communication; parfois une barrière conjonctive unit les deux gonades et sépare leurs cordons.

Les gonocytes des deux sexes colonisent très aisément les cordons ou tubes étrangers. Ainsi voisinent parfois, dans un même complexe structural, des ovocytes et des spermatogonies des deux espèces. L'on voit par exemple des ovocytes de souris dans un épithélium germinatif de canard, des spermatogonies de canard dans des tubes séminaux de souris et réciproquement des spermatogonies de souris dans des tubes de canard. Mais ces relations s'observent surtout dans la zone de contact; on ne les voit généralement pas dans des régions éloignées de cette zone.

Il n'en est pas de même des cellules conjonctives, qui pénètrent très loin dans la gonade étrangère, en profitant de certaines voies d'invasion. Elles se comportent comme les cellules conjonctives de l'hôte, s'insinuant sous la basale de l'épithélium germinatif, et entre les cordons. Elles soulignent, par leur différence

de forme et de coloration, la répartition du tissu conjonctif à l'intérieur d'un organe. Il existe une attraction évidente des gonades de canard pour le conjonctif de souris. Encore que cette affinité ne puisse être considérée comme élective et qu'elle représente probablement une attraction banale, on est obligé de constater que la gonade de canard constitue un milieu favorable et même stimulant pour le conjonctif de souris.

On peut comparer ces migrations à l'intérieur d'un organe étranger à des phénomènes analogues du développement normal d'un organisme: migration des cellules des crêtes ganglionnaires et de leurs dérivés, les chromatoblastes; migration des cellules mésenchymateuses et de leurs dérivés, en particulier le tissu conjonctif. Il est remarquable que les cellules conjonctives de souris effectuent, dans une gonade déjà colonisée par du tissu conjonctif autochtone, des déplacements considérables, suivant les voies mêmes que suivent très généralement les cellules migratrices.

En définitive, on n'observe ni répulsion ni intolérance entre les tissus de deux gonades, homologues ou hétérologues, provenant de deux classes zoologiques différentes, mais au contraire une union et une attraction parfois très intense.

De telles associations ne seraient sans doute pas viables à l'échelle des embryons entiers, soit qu'on associe deux embryons, soit que l'on greffe un organe étranger à l'intérieur d'un embryon d'une autre classe: nous n'avons pas connaissance que de telles greffes aient réussi, exception faite des greffes de tissus de Mammifères sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon d'Oiseau.

De telles associations sont en tout cas impossibles chez des Mammifères adultes, qui montrent une intolérance rigoureuse vis-à-vis de toute greffe homoplastique, à plus forte raison de tout transplant hétéroplastique ou xénoplastique. Des réactions d'immunité s'opposent à de tels transferts. Les remarquables recherches de Medawar et de ses collaborateurs nous ont montré récemment que cette difficulté pouvait être tournée, si l'on accoutume l'organisme, dès le stade embryonnaire, à l'intrusion de tissus étrangers (1953). Ainsi a pu être réalisée la greffe homoplastique de peau de souris blanche sur souris pigmentée.

Nos résultats montrent de leur côté qu'il n'y a pas d'incompatibilité entre des organes embryonnaires provenant de deux groupes très différents. Il est vraisemblable que, dans les conditions de nos expériences, ils n'élaborent pas d'anticorps. Ce résultat pose de nouveaux problèmes: la compatibilité entre tissus étrangers est-elle due aux conditions de l'explantation *in vitro*, en particulier au fait que les deux organes sont élevés sur le même milieu, à base d'extrait d'embryon de poulet? Les mêmes conditions pourraient-elles se produire dans les expériences de greffes intra-embryonnaires? En d'autres termes, on peut se demander si l'organisme entier est aussi tolérant que l'organe isolé, et s'il ne fabrique pas déjà aux stades embryonnaires les anticorps spécifiques anti-organes. Il ne faut pas oublier que, dans les expériences de culture *in vitro*, les organes sont libérés des apports du sang circulant.

D'autre part, on peut se demander quelle est la durée de la tolérance des

organes associés. Cette question présente deux aspects: la parabiose en culture est-elle limitée dans le temps et peut-elle être prolongée autant que la culture d'organes isolés? D'autre part, la tolérance mutuelle que montrent des organes embryonnaires de classes différentes, vers le milieu de l'incubation ou de la gestation, existe-t-elle encore à la fin de la vie embryonnaire, après la naissance, chez l'adulte? Ce sont là autant de problèmes qui sont actuellement à l'étude et que la culture d'organes donne la possibilité de résoudre.

RÉSUMÉ

1. Des gonades embryonnaires de souris, prélevées entre le 13^{ème} et le 16^{ème} jour de la gestation, ont été associées en culture *in vitro* à des gonades embryonnaires de canard, prélevées entre le 8^{ème} et le 11^{ème} jour de l'incubation. Le milieu de culture utilisé est le milieu 'standard', mis au point par Et. Wolff & K. Haffen au Laboratoire d'Embryologie expérimentale de Strasbourg.

2. Les gonades de deux classes zoologiques différentes se fusionnent en culture, quel que soit leur sexe, de manière à former un ensemble indissociable où l'on reconnaît difficilement, à l'aspect extérieur, les limites des deux composants.

3. A l'aspect histologique, on peut en général reconnaître le domaine respectif des deux partenaires, sauf dans la région mitoyenne, où des rapports s'établissent entre les tissus somatiques et les tissus germinaux des deux espèces. Dans toutes les combinaisons, il y a toujours une intrication des tissus conjonctifs.

4. Dans l'association testicule de canard—testicule de souris, on voit des cellules conjonctives de souris s'insinuer sous l'épithélium germinatif de canard et se propager loin de leur territoire d'origine (Planche 1, fig. B). Des tubes testiculaires de souris se mettent en communication avec des tubes testiculaires de canard, formant des tubes-chimères (Planche 1, fig. A et C), dans lesquels des cellules de Sertoli des deux espèces contribuent à former la paroi des tubes, dans lesquels des spermatogonies de souris côtoient des spermatogonies de canard (Planche 1, fig. D).

5. Dans l'association ovaire de canard—ovaire de souris, les tissus ont tendance à s'intriquer (Planche 2, fig. G), les tissus somatiques et les cellules germinales des deux espèces voisinent dans la zone commune (Planche 1, fig. E), le cortex de canard a tendance à envelopper la gonade de souris (Planche 2, fig. F).

6. Dans l'association ovaire de souris—testicule de canard, un cortex ovarien, plus ou moins épais, se forme à la surface du testicule de canard. Les cellules conjonctives de souris migrent à de grandes distances sous la basale de ce cortex (Planche 2, fig. H) et entre les cordons testiculaires du canard. Au voisinage de la zone de contact, on trouve des cellules somatiques et des ovocytes de souris dans les tubes testiculaires de canard (Planche 2, fig. H et I).

7. Dans l'association ovaire de canard—testicule de souris, les tissus somatiques s'enchevêtrent aux environs de la zone de contact. Les cordons de Pflüger

de canard s'ouvrent et se prolongent dans les tubes testiculaires de souris, où l'on observe des ovogonies de canard à côté de spermatogonies de souris (Planche 2, fig. J et K).

8. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas incompatibilité entre deux gonades de classes zoologiques différentes, associées en parabiose directe *in vitro*. Leurs tissus peuvent se mêler, sans manifester de répulsion. On peut au contraire parler, dans certains cas, de collaboration et d'affinités entre les cellules des deux partenaires.

La question se pose de savoir combien de temps et jusqu'à quels stades de telles associations xénoplastiques sont possibles, et pourquoi deux organes embryonnaires associés montrent une tolérance mutuelle, qu'on n'observe pas dans les expériences de greffes pratiquées chez des animaux adultes.

SUMMARY

1. Gonads, dissected from mouse embryos of between the 13th and 16th days of gestation, were associated *in vitro* with embryonic gonads from ducks at the 8th to 11th day of incubation. The culture medium was the 'standard medium' elaborated by Et. Wolff and K. Haffen at the Laboratory of Experimental Embryology of Strasbourg.

2. Gonads coming from these two different zoological classes will fuse together, whatever their sex, so that they form an inseparable unit, in which it is difficult to see from the exterior the limits of the two components.

3. Histologically, the field of each partner is generally distinct, except in the intermediate region, where close connexions are formed between somatic and germinal tissues of both species. In all combinations, the connective tissues are always intermingled.

4. *In the association of duck testis with mouse testis*, connective tissue cells of the mouse slip under the germinal epithelium of the duck and spread far from their initial area (Plate 1, fig. B). Mouse seminal tubules communicate with duck seminal tubules, forming chimeric structures (Plate 1, figs. A and C). Sertoli cells of both species collaborate in the formation of the wall of the tubules, in which mouse spermatogonia are to be seen alongside duck spermatogonia (Plate 1, fig. D).

5. *In the association of duck ovary with mouse ovary*, somatic and germinal cells show a tendency to be intermingled (Plate 1, fig. E; Plate 2, fig. G) in the intermediate zone; the cortex of the duck has a tendency to surround the whole gonad of the mouse (Plate 2, fig. F).

6. *In the association of mouse ovary with duck testis*, an ovarian cortex, more or less thick, is formed around the duck testes. Connective tissue cells of the gonad of the mouse migrate far from their origin under the basal membrane of this cortex (Plate 2, fig. H) and between the testicular cords of the duck. In the contact zone, somatic cells and ovocytes of the mouse are to be found in the testicular tubules of the duck (Plate 2, figs. H and I).

7. *In the case of an association between duck ovary and mouse testis*, somatic tissues are mixed in the neighbourhood of the contact zone. Pflüger's cords of the duck open into the testicular tubules of the mouse, so that duck ovogonia are to be seen close beside mouse spermatogonia (Plate 2, figs. J and K).

8. These results give evidence that there is no incompatibility between embryonic gonads of two different zoological classes when they are directly associated in a culture medium *in vitro*. Their tissues are able to fuse together, without any sign of repulsion. In several cases cells of both partners show, on the contrary, affinities and the ability to collaborate. How often and up to what stage of the embryonic or postnatal life such xenoplastic associations are possible is still an unsolved problem. Another problem to which the present data lead is the difference in the behaviour of xenoplastic associations *in vitro* and in graft experiments.

TRAVAUX CITÉS

- BALTZER, F. (1940a). Über erbliche letale Entwicklung und Austauschbarkeit artverschiedener Kerne bei Bastarden. *Naturwissenschaften*, **28**, 177-87 et 196-206.
- (1940b). Über das Verhalten ordnungsfremder Pigmentzellen bei Amphibienlarven (Austausch von Ganglienleiste zwischen Hyla und Urodelen). *Verh. schweiz. naturf. Ges.*, Locarno, 177-80.
- (1941). Untersuchungen an Chimären von Urodelen und Hyla. *Rev. suisse Zool.* **48**, 414-82.
- (1950). Chimäre und Merogone bei Amphibien. *Rev. suisse Zool.* **57**, Supplément, 93-114.
- MEDAWAR, P. B., BILLINGHAM, R. E., & BRENT, L. (1953). 'Actively acquired tolerance' of foreign cells. *Nature, Lond.* **172**, 603-12.
- NICHOLAS, J. S., & RUDNICK, D. (1933). The development of embryonic rat tissues upon the chick chorio-allantois. *J. exp. Zool.* **66**, 193-261.
- WOLFF, ET., & HAFFEN, K. (1952a). Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Texas Rep. Biol. Med.* **10**, 463-72.
- (1952b). Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'oiseau en culture *in vitro*. *J. exp. Zool.* **119**, 381-404.
- (1952c). Sur l'intersexualité expérimentale des gonades embryonnaires de canard, cultivées *in vitro*. *Arch. Anat. micr.* **41**, 184-207.
- (1952d). Action féminisante de la gonade droite de l'embryon femelle de canard en culture *in vitro*. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **146**, 1772-4.

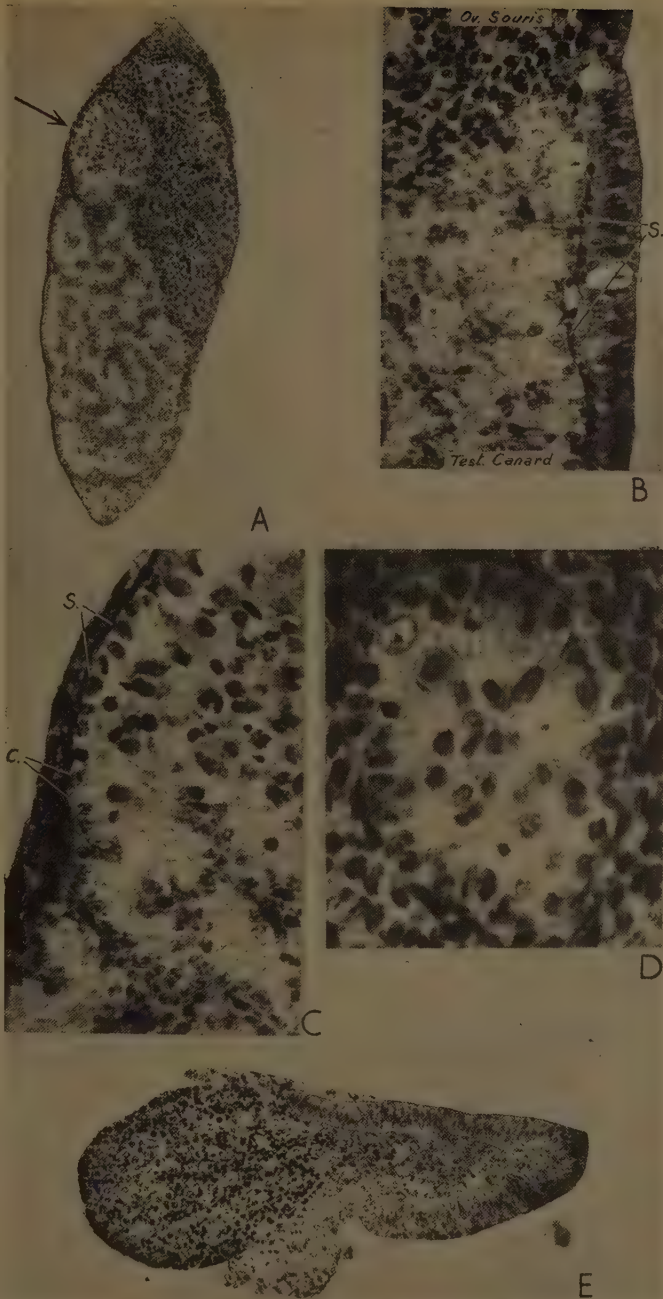
EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE 1

FIG. A. Association-chimère d'un testicule de souris et d'un testicule de canard, après 5 jours de culture (âge du testicule de souris au moment du prélèvement: 13-14 jours; âge du testicule de canard: 11 jours). On voit, à droite, les méandres des tubes testiculaires de canard, à gauche et en haut, les ampoules testiculaires de souris. Dans la région de contact, on voit un tube de canard communiquer avec un tube de souris. Un tube testiculaire mixte s'est formé à l'emplacement marqué d'une flèche. Grossissement: 110 ×.

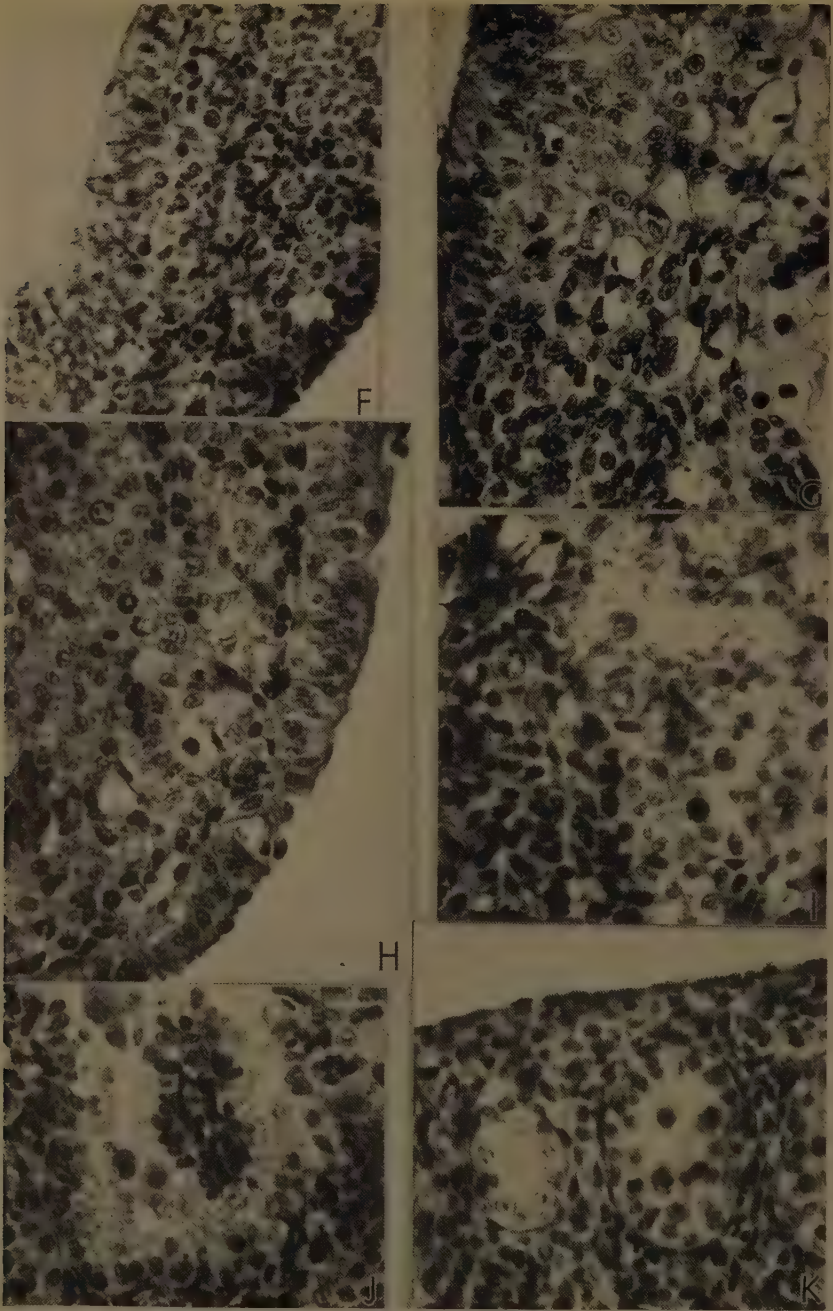
FIG. B. Association testicule souris-testicule canard. Détail de la région de contact. Le testicule de canard, de teinte claire, est bordé d'un épithélium germinatif épais, sous lequel se glissent des cellules conjonctives de souris (S.), remarquables par leur coloration foncée. Grossissement: 300 ×.

FIG. C. Détail d'un tube testiculaire mixte d'une chimère de souris-canard. L'épithélium de Sertoli, constitué en haut de cellules de souris (S.), est formé en bas de cellules de canard (C.).



ET. WOLFF & J.-P. WENIGER

Planche I



ET. WOLFF & J.-P. WENIGER
Planche 2

Dans la zone de transition, des cellules de souris alternent avec des cellules de canard. A l'intérieur du tube, on voit de nombreuses spermatogonies de souris. Grossissement: 410 $\times$.

FIG. D. Dans une association testicule souris-testicule canard, on voit, à l'intérieur d'un tube testiculaire de souris, une spermatogonie de canard, à gros noyau clair, voisiner avec des spermatogonies de souris, à noyau sombre et chromatine poussiéreuse. Grossissement: 595 $\times$.

FIG. E. Association ovaire souris (15 jours)-ovaire canard (8 jours), après 4 jours de culture. A gauche, l'ovaire de souris; à droite, l'ovaire de canard. On voit l'ovaire de souris pénétrer en pointe dans la médullaire de canard, à laquelle ses tissus se mêlent, et le cortex de canard recouvrir une partie de la gonade de souris. Grossissement: 170 $\times$.

PLANCHE 2

FIG. F. Autre chimère ovaire souris-ovaire canard, où l'on voit l'épithélium de canard, à gauche, recouvrir l'ovaire de souris. Plusieurs ovocytes de souris se sont logés dans l'épithélium de canard. Grossissement: 300 $\times$.

FIG. G. Zone de contact de deux ovaires associés. On voit l'interpénétration des tissus somatiques. Les cellules folliculeuses et conjonctives de canard, aux noyaux très sombres, pénètrent en masse dans la médullaire vacuolaire et dans le cortex de canard. Grossissement: 400 $\times$.

FIG. H. Combinaison entre un testicule de canard (8 jours) et un ovaire de souris (13 jours), après 6 jours de culture. Un épithélium germinatif épais se développe sur le testicule de canard: c'est une ébauche de cortex ovarien (à droite). On voit s'insinuer, sous cet épithélium, des cellules conjonctives de souris à noyaux sombres et allongés. Dans la région sous-jacente des cordons testiculaires, il y a une intrication de tissus de souris et de canard: de nombreuses cellules conjonctives de souris se glissent entre les cordons, à l'intérieur desquels des spermatogonies de canard, à gros noyaux clairs, voisinent avec des ovocytes de souris, à gros noyaux empâtés sur les bords. Grossissement: 420 $\times$.

FIG. I. Association ovaire de souris (15-16 jours)-testicule de canard (8 jours), après 6 jours de culture. Zone de contact entre les deux gonades. A gauche: ovaire de souris, à droite: tubes conjonctives de souris se glissent entre les cordons, à l'intérieur desquels des spermatogonies de canard, à gros noyaux clairs, voisinent avec des ovocytes de souris, à gros noyaux empâtés sur les bords. Grossissement: 420 $\times$.

FIG. J. Association ovaire canard-testicule souris. Non loin de la région mitoyenne des deux gonades, un tube testiculaire de souris contient des ovogonies de canard (noyaux clairs à nucléole central, à droite et en bas), au voisinage des spermatogonies de souris (noyaux sombres à chromatine diffuse, à gauche). Grossissement: 420 $\times$.

FIG. K. Association ovaire canard-testicule souris. En plein testicule de souris, on voit des cellules germinales de canard dans les tubes testiculaires. A droite, un tube normal renfermant des spermatogonies de souris; à gauche, un tube tapissé par des ovogonies de canard. Grossissement: 420 $\times$.

The Significance of Inductive Relationships in the Development of Vertebrates

by P. B. MEDAWAR¹

From the Department of Zoology, University College, University of London

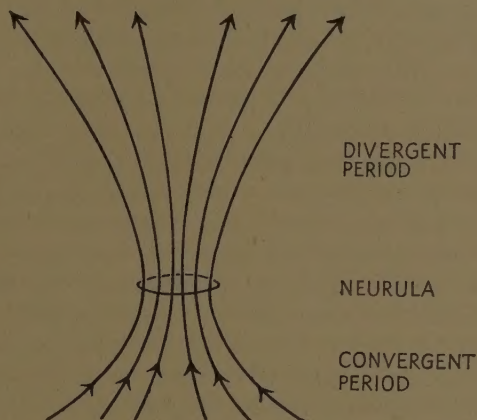
ONE of the most conspicuous characteristics of the development of vertebrates is the adaptive specialization of pre-gastrular larvae. The eggs of vertebrates are laid upon land, in fresh water, in the sea, or within the mothers; the quantity of yolk they contain varies from the minute to the almost prodigious; they may develop at temperatures ranging from little above zero to little below 40° C., and at very different rates; the membraneous investments of egg and embryo are of widely different kinds; and so on. And accordingly we find that, although the strategy of pre-gastrular development is much the same in all vertebrates (inasmuch as all early development is directed towards the establishment of an axiate neurula of very uniform pattern), the overt tactics are in the very highest degree diverse. One need only reflect upon the variety of manœuvres that lead to the formation of endoderm, or upon the very different patterns of chorda-mesodermal invagination, to be convinced that this proposition is a truism.

From early cleavage onwards, however, the embryos of chordates grow progressively more alike—up to a certain period. The stage of development at which the vertebrates differ from each other least is that of the late neurula, distinguished by the dorsal nerve tube with its four primary subdivisions; the notochord, dorsal aorta, and cardinal veins; the somites, the subdivisions of the coelom, and the pronephros; the endopharyngeal apparatus and the heart; and much more besides. Indeed, Von Baer's Laws express the very reverse of the truth for pre-gastrular development in vertebrates: any layman can distinguish the egg of a dogfish from a hen's egg or a frog's, but a certain modest knowledge of embryology is needed before one can distinguish a transverse section of a dogfish's embryo from a chick's at the neurula stage.

One might therefore describe the earliest stages of vertebrate development as anatomically *convergent*, because from very different beginnings the embryos become progressively more alike. After the neurula stage, development is *divergent*, as Von Baer's Laws affirm: each embryo gradually assumes the characteristics that distinguish the adults into which they ultimately develop. The accompanying diagram illustrates this conception. It should be added,

¹ Author's address: Department of Zoology, University College London, Gower Street, W.C.1, U.K.

of course, that the eggs of vertebrates, no matter how great their anatomical diversity may be, must certainly have a fundamental ground-plan in common, and the discovery of this ground-plan is one of the principal agenda of embryological research; but we are concerned here with those tangible differences of size, shape, composition, and developmental procedure which form the subject-matter of descriptive embryology.



TEXT-FIG. 1

What is the significance of the convergent phase of vertebrate development for causal embryology? My suggestion is that adaptive diversification during the convergent phase of vertebrate development has been made possible by a special adaptive device, viz. the existence of *inductive relationships* between many of the constituent parts of the embryo. For it is clear that the existence of an inductive relationship between two parts allows the embryo a latitude of development, an extra degree of freedom, that is denied to parts which are rigidly determined in respect of their ultimate fates. Consider, for example, the inductive relationship between eye-cup and lens. In many species the lens is caused to form from the ectoderm by the action of the eye-cup that underlies it. Presumptive lens and presumptive eye-cup occupy different positions in the blastula, and in the course of morphogenetic movements the two little cell populations travel by very different pathways before they reach their definitive stations. If both were independently 'determined' at a stage before they came together, it might often happen that the lens failed to reach exactly the right position when the morphogenetic movements were complete. But if the formation of the lens were dependent upon the action of the eye-cup, and competence to form a lens were distributed over a somewhat wider area than that from which a lens is actually formed, then a much greater latitude of morphogenetic movements would be

permissible: the lens would still be formed in the 'right' place. The same considerations, *mutatis mutandis*, apply to the relationship between the roof of the archenteron and the ectoderm that forms the neural tube. (The fact that the classical examples of the inductive relationship concern organ systems whose constituent parts have, so to speak, come together from afar may itself be of genuine embryological significance; but, on the other hand, it may simply mean that systems of this kind are the most accessible to experiment.)

It is therefore arguable that the special flexibility which the inductive relationship allows may have made possible the adaptive radiation of the pre-gastrular larvae of vertebrates. Induction may itself be best thought of as an adaptive specialization. There are indeed good grounds for thinking that the convergent phase of development is a new episode in the evolution of chordate ontogeny. Tunicates are notorious for their quick-developing, determinate embryos, but Berrill's (1945) quantitative analysis of the relative rates of development and determination (using cellular number as a time-marker) shows that chordate evolution has been accompanied by a progressive drawing-out of early development and a retardation of determinative processes, with *Amphioxus* representing a half-way house. The idea (it is hardly more than an attitude of mind) that inductive activity is the causal centre-piece of development, and is of fundamental and all-pervasive significance, should therefore probably be revised.

The gist of the foregoing argument has been given in outline elsewhere (Medawar, 1947).

REFERENCES

- BERRILL, N. J. (1945). Size and organization in the development of Ascidians. In *Essays on Growth and Form*, ed. W. E. le Gros Clark and P. B. Medawar (Oxford, 1945).
 MEDAWAR, P. B. (1947). Cellular inheritance and transformation. *Biol. Rev.* **22**, 360-89.

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

Contributions and correspondence about them should be sent to Mr. M. Abercrombie, Department of Anatomy and Embryology, University College, Gower Street, London, W.C.1, England.

Contributions should be as concise as possible. They should be typewritten, double-spaced, on one side of the paper, the pages numbered. They should be fully ready for press, since revision in proof will not be possible. Footnotes should be avoided. The author is advised to keep a copy of the typescript.

Tables should be on separate sheets, and numbered. Authors should indicate the places for their insertion in the margin of the typescript.

The Summary should be in numbered paragraphs, and will be put at the end of the text. It should not exceed 500 words.

Acknowledgements should be placed immediately before the list of references.

References should be listed alphabetically. In the text they should be referred to by the author's name and the year of publication. If more than one reference to the same author and year is quoted, use suffixes *a*, *b*, &c. (e.g. 1951*a*) in text and reference list. Papers should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title of paper; name of journal (*World List of Scientific Periodicals* abbreviation), underlined; volume number; first and last page: e.g. Spemann, H., & Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. mikr. Anat.* **100**, 599-683. Books should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title underlined; place of publication; publisher: e.g. Dalcq, A. (1941). *L'Œuf et son dynamisme organisateur*. Paris: Albin Michel.

Illustrations. Line drawings should be used wherever possible, in preference to illustrations requiring half-tone reproduction. In general, their size should be such that they are reduced for publication to approximately two-thirds linearly. When reduced, no illustration together with its lettering should exceed five inches in width, and, if it is to occupy a whole page, seven and a half inches in length. Name of author and figure number should be written on

the back, together with the proposed reduction in size. Magnification should be indicated by a scale-line drawn in Indian ink on or beside all drawings and photographs.

Black and white line or line and dot drawings should have all lettering or numerals put in lightly in block capitals with a soft pencil. Charts and graphs may be drawn in Indian ink on graph paper ruled in pale blue. Where several drawings are grouped as one figure, distinguish them by capital letters (in pencil). Legends for all line drawings should be typed together on a separate sheet. The places for insertion in the text should be indicated in the margin of the typescript. The drawings should be referred to in the text as 'Text-fig. 1', &c.

Half-tone illustrations (photographs or drawings other than black and white) will be limited in number; authors may be asked to provide a grant for an excessive number. If fine detail is not required they can be reproduced amongst the text (please indicate position), in which case they should be numbered in series with the line drawings, if any. If fine detail is required, they will be on a separate plate. The legends should then be typed on a separate sheet, headed 'Explanation of Plate(s)', and the illustrations should be referred to in the text as 'Plate 1, fig. A', &c. Leader lines should be drawn in Indian ink. All letters or numerals which are to go on the illustration, should be in pencil (block capitals) on a covering sheet of transparent paper. Lettering or numerals to go at the side should be written there in pencil (block capitals); photographs, for this purpose, should be mounted on card. If the author wishes the block-maker to pay special attention to reproducing any part of an illustration, he should indicate this on the transparent paper. Photographs should be glossy bromide prints.

Proofs. Authors will receive one set of proofs for correction and return to the Editor. Authors may be required to pay for an excessive number of alterations in proof, apart from printer's errors.

Reprints. Authors will receive fifty free reprints. Additional copies may be ordered for purchase when proofs are returned to the Editor.

Journal of Embryology and Experimental Morphology

[J. Embryol. exp. Morph.]

VOLUME 2

June 1954

PART 2

Contents

KÄLLÉN, BENGT

- The Embryology of the Telencephalic Fibre Systems in
the Mouse 87
With 1 plate

NEWTN, D. R.

- Determination in the Cranial Neural Crest of the Axolotl 101
With 1 plate

GALLERA, J., *et* BAUD, C. A.

- Étude ultrastructurale de l'ectoblaste chez l'embryon
d'Urodèle normal ou traité par l'urée 106
With 1 plate

THOMAS, G. A.

- The Effect of Cortisone on Cell Proliferation and Migra-
tion in Peripheral Nerves undergoing Wallerian degenera-
tion 114

PASTEELS, J.

- Les effets de la centrifugation sur la blastula et la jeune
gastrula des Amphibiens 122
III. Interactions entre ébauches primaires et secondaires
IV. Discussion générale et conclusions
With 1 plate

MCLAREN, ANNE, *and* MICHIE, DONALD

- Factors affecting Vertebral Variation in Mice 149
I. Variation within an Inbred Strain
With 1 plate

WOLFF, ÉTIENNE, *et* WENIGER, J.-P.

- Recherches préliminaires sur les chimères d'organes em-
bryonnaires d'oiseaux et de mammifères en culture *in vitro* 161
With 2 plates

MEDAWAR, P. B.

- The Significance of Inductive Relationships in the De-
velopment of Vertebrates 172